

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Mariko Ogura

of 6th Fl., Kantetsu Tsukuba-Science-City Bldg. 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura, Ibaraki, JAPAN

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese languages, and
2. That the attached document is a true and correct translation made by me to the best of my knowledge and belief of:

Japanese Patent Application No. Hei 10-299962

Entitled: METHOD FOR SCREENING COMPOUNDS INHIBITING SIGNAL
TRANSDUCTION THROUGH INFLAMMATORY CYTOKINES

Filed on October 21, 1998

June 24, 2003
(Date)

Mariko Ogura
(Signature of the translator)
Mariko Ogura

1

REC'D 10 DEC 1999
WIPO PCT

09/83014
PCT/JP99/05817

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

21.10.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月21日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第299962号

出願人
Applicant(s):

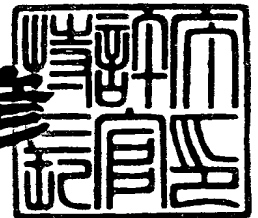
中外製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3081614

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-005

【提出日】 平成10年10月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法

【請求項の数】 40

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 土屋 政幸

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 大友 俊彦

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 菅又 泰博

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区北千種2-1-43 萱場住宅1
-205

 【氏名】 松本 邦弘

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

 【代表者】 永山 治

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) TAK1、TAB1及び被験試料を接触させる工程、
- (b) TAK1とTAB1との結合の形成を検出する工程、および
- (c) TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項2】 TAK1及び／又はTAB1が他のペプチドと融合している、請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項3】 TAK1又はTAB1が支持体と結合している、請求項1又は2に記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 TAK1又はTAB1を標識し、該標識を検出又は測定することによりTAK1とTAB1との結合の形成を検出する、請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項5】 TAK1に結合したTAB1を、TAB1に対する一次抗体又はTAB1と融合した他のペプチドに対する一次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項6】 TAB1に結合したTAK1を、TAK1に対する一次抗体又はTAK1と融合した他のペプチドに対する一次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項7】 TAK1に結合したTAB1を、TAB1に対する一次抗体又はTAB1と融合した他のペプチドに対する一次抗体及び該一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項8】 TAB1に結合したTAK1を、TAK1に対する一次抗体又はTAK1と融

合した他のペプチドに対する一次抗体及び該一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項9】 一次抗体又は二次抗体が、放射性同位元素、酵素又は蛍光物質により標識されている、請求項5～8のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項10】 TAK1とTAB1との結合の形成を、これら蛋白質の結合に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、請求項2に記載の方法。

【請求項11】 レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン又はベータガラクトシダーゼである、請求項10に記載のスクリーニング方法。

【請求項12】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) TAK1及び被験試料を接触させる工程、
- (b) TAK1によるリン酸化反応を検出する工程、および
- (c) TAK1によるリン酸化反応を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項13】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) TAK1、TAB1及び被験試料を接触させる工程、
- (b) TAK1によるリン酸化反応を検出する工程、および
- (c) TAK1によるリン酸化反応を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項14】 TAK1の基質を加えてTAK1による該基質に対するリン酸化反応を検出する、請求項12又は13に記載のスクリーニング方法。

【請求項15】 TAK1の基質がMKK6及び／又はMKK3である、請求項14に記載のスクリーニング方法。

【請求項16】 TAK1が他のペプチドと融合している、請求項12～15のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

【請求項17】 TAK1が支持体と結合している、請求項12～16のいずれ

か 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 18】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) TAK1を発現する細胞に被験試料を導入及び／又は接触させる工程、

(b) TAK1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する工程、および

(c) TAK1を介して伝達される生物学的活性を減少させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 19】 TAK1を介して伝達される生物学的活性が炎症性サイトカインの生物学的活性である、請求項 18に記載のスクリーニング方法。

【請求項 20】 TAK1を介して伝達される生物学的活性を該活性に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、請求項 18に記載のスクリーニング方法。

【請求項 21】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) TAK1及びTAB1を発現する細胞に被験試料を導入及び／又は接触させる工程、

(b) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する工程、および

(c) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を減少させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 22】 TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性がIL-1又はTNFの生物学的活性である、請求項 21に記載のスクリーニング方法。

【請求項 23】 TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を該活性に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、請求項 21に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】 レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン又はベータガラクトシダーゼである請求項 20又は23に記載のスクリーニング方法。

【請求項 25】 細胞に炎症性の刺激を加え、TAK1、又はTAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する請求項 18～24 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】 炎症性の刺激がIL-1、TNF又はLPSである請求項 25 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】 炎症性サイトカインがIL-1、TNF、IL-10又はIL-6である、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 28】 請求項 1～27 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法により単離しうる、炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害するための化合物。

【請求項 29】 請求項 28 に記載の化合物を有効成分として含有する、医薬組成物。

【請求項 30】 TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤。

【請求項 31】 TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインの作用阻害剤。

【請求項 32】 TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインの産生阻害剤。

【請求項 33】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害するための医薬組成物。

【請求項 34】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインの作用を阻害するための医薬組成物。

【請求項 35】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインの産生を阻害するための医薬組成物。

【請求項 36】 抗炎症剤である、請求項 33～35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 37】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物がTAK1とTAB1との結合を阻害する化合物である、請求項 33～36 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 38】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物がTAK1のリン酸化反応を阻害する化合物である、請求項 33～36 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 39】 TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物が請求項 1～27 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法で単離しうる化合物である、請求項 33～38 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 40】 炎症性サイトカインがIL-1、TNF、IL-10又はIL-6である、請求項 33～39 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明はまた、該スクリーニング方法により単離しうる化合物及びその用途に関する。本発明はさらに、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤、例えば、炎症性サイトカインの作用阻害剤、産生阻害剤、及び抗炎症剤に関する。

【0002】

【従来技術】

細胞内のシグナル伝達に関与する一連の系として、マイトジェン-活性化プロテインキナーゼ (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK) 系が知られている。

【0003】

MAPK系は受容体のシグナルを種々の作用に転換する保存された真核細胞性シグナル伝達系である。MAPK系は3種類のプロテインキナーゼ、すなわちMAPKKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase)、MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)、MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) を含む。MAPKはMAPKKによるリン酸化で活性化される。MAPKKはMAPKKKによるリン酸化で活性化される (Nishida, E. et al., Trends Biochem. Sci. (1993) 18, 128、Blumberg, K. J. et al., Trends Biochem. Sci. (1993) 19, 236、David R. J. et

al., Trends Biochem. Sci. (1993) 19, 470, Marchall, C. J. et al., Cell (1995) 80, 179)。

【0004】

細胞内のシグナル伝達系において機能するMAPKKKファミリーの一つであるTAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1) はYamaguchi, K.らにより同定された蛋白質であり (Yamaguchi, K. et al., Science (1995)270, 2008)、TGF- β のシグナル伝達に関与しTGF- β により活性化されることが明らかになっている。

【0005】

また、TAK1に結合し、TAK1を活性化するTGF- β のシグナル伝達系に関与する蛋白質であるTAB1 (TAK1 Binding Protein 1) がShibuya, H.らにより同定された (Shibuya, H. et al., Science (1996) 272, 1179-1182)。TAB1はTAK1に結合してTAK1のキナーゼ活性を活性化し、TGF- β のシグナルを伝達する。

【0006】

ごく最近になって、TAK1が腫瘍壊死因子 (TNF) とインターロイキン-1 (IL-1) によっても活性化されることが報告された (Shirakabe, K. et al., J. Biol. Chem. (1997) 272, 8141)。また、TAK1活性化に引き続き転写因子NF- κ Bの活性化が誘導されることが報告されている (Moriguchi, T., et al., J. Biol. Chem. (1996) 271, 13675 ; Ponton, A., et al., J. Biol. Chem. (1996) 271, 8991 ; Sakurai S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 243, 545)。

【0007】

しかしながら、TAK1のシグナル伝達を阻害することで、実際にLPSなどの炎症性の刺激またはサイトカイン刺激による細胞応答、例えば炎症メディエーターとなる炎症性サイトカインのシグナル伝達が阻害され、炎症性サイトカインの作用が抑制されること、さらには、炎症性サイトカインの産生が抑制されることは全く知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、TAK1に関連した炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合

物をスクリーニングする方法を提供する。本発明はまた、該スクリーニング方法により単離しうる化合物及びその用途を提供する。本発明はさらに、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤、例えば、炎症性サイトカインの作用阻害剤、産生阻害剤、及び抗炎症剤を提供する。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明において、TAK1のシグナル伝達を阻害することにより、炎症性サイトカインの作用が抑制されること、さらには、炎症性の刺激により誘導されるIL-1及びTNF等の炎症性サイトカインの産生が抑制されること、及び炎症性サイトカインにより誘導されるIL-6等の他の炎症性サイトカインの産生が抑制されることが見いだされた。本発明はこの知見に基づいてなされたものである。

【0010】

従って、本発明は、

(1) 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) TAK1、TAB1及び被験試料を接触させる工程、

(b) TAK1とTAB1との結合の形成を検出する工程、および

(c) TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、

(2) TAK1及び／又はTAB1が他のペプチドと融合している、(1)に記載のスクリーニング方法、

(3) TAK1又はTAB1が支持体と結合している、(1)又は(2)に記載のスクリーニング方法、

(4) TAK1又はTAB1を標識し、該標識を検出又は測定することによりTAK1とTAB1との結合の形成を検出する、(1)～(3)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(5) TAK1に結合したTAB1を、TAB1に対する一次抗体又はTAB1と融合した他のペプチドに対する一次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、(1)～(3)のいずれか1項に記載のスクリーニング

方法、

(6) TAB1に結合したTAK1を、TAK1に対する一次抗体又はTAK1と融合した他のペプチドに対する一次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、(1)～(3)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(7) TAK1に結合したTAB1を、TAB1に対する一次抗体又はTAB1と融合した他のペプチドに対する一次抗体及び該一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、(1)～(3)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(8) TAB1に結合したTAK1を、TAK1に対する一次抗体又はTAK1と融合した他のペプチドに対する一次抗体及び該一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することにより、TAK1とTAB1との結合の形成を検出する、(1)～(3)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(9) 一次抗体又は二次抗体が、放射性同位元素、酵素又は蛍光物質により標識されている、(5)～(8)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(10) TAK1とTAB1との結合の形成を、これら蛋白質の結合に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、(2)に記載の方法、

(11) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン又はベータガラクトシダーゼである、(10)に記載のスクリーニング方法、

(12) 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) TAK1及び被験試料を接触させる工程、

(b) TAK1によるリン酸化反応を検出する工程、および

(c) TAK1によるリン酸化反応を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) TAK1、TAB1及び被験試料を接触させる工程、

- (b) TAK1によるリン酸化反応を検出する工程、および
- (c) TAK1によるリン酸化反応を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (14) TAK1の基質を加えてTAK1による該基質に対するリン酸化反応を検出する、(12)又は(13)に記載のスクリーニング方法、
- (15) TAK1の基質がMKK6及び／又はMKK3である、(14)に記載のスクリーニング方法、
- (16) TAK1が他のペプチドと融合している、(12)～(15)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、
- (17) TAK1が支持体と結合している、(12)～(16)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、
- (18) 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) TAK1を発現する細胞に被験試料を導入及び／又は接触させる工程、
 - (b) TAK1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する工程、および
 - (c) TAK1を介して伝達される生物学的活性を減少させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- (19) TAK1を介して伝達される生物学的活性が炎症性サイトカインの生物学的活性である、(18)に記載のスクリーニング方法、
- (20) TAK1を介して伝達される生物学的活性を該活性に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、(18)に記載のスクリーニング方法、
- (21) 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) TAK1及びTAB1を発現する細胞に被験試料を導入及び／又は接触させる工程、
 - (b) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する工程、および
 - (c) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を減少させる化合物を選択

する工程、を含む方法、

(22) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性がIL-1又はTNFの生物学的活性である、(21)に記載のスクリーニング方法、

(23) TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を該活性に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、(21)に記載のスクリーニング方法、

(24) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン又はベータガラクトシダーゼである(20)又は(23)に記載のスクリーニング方法、

(25) 細胞に炎症性の刺激を加え、TAK1、又はTAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定する(18)～(24)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(26) 炎症性の刺激がIL-1、TNF又はLPSである(25)に記載のスクリーニング方法、

(27) 炎症性サイトカインがIL-1、TNF、IL-10又はIL-6である、(1)～(26)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法、

(28) (1)～(27)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法により単離しうる、炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害するための化合物、

(29) (28)に記載の化合物を有効成分として含有する、医薬組成物、

(30) TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤、

(31) TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインの作用阻害剤、

(32) TAK1のシグナル伝達阻害作用を有する、炎症性サイトカインの産生阻害剤、

(33) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害するための医薬組成物、

(34) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインの作用を阻害するための医薬組成物、

(35) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインの産生を阻害するための医薬組成物、

(36) 抗炎症剤である、(33)～(35)のいずれか1項に記載の医薬組成物、

(37) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物がTAK1とTAB1との結合を阻害する化合物である、(33)～(36)のいずれか1項に記載の医薬組成物、

(38) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物がTAK1のリン酸化反応を阻害する化合物である、(33)～(36)のいずれか1項に記載の医薬組成物、

(39) TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物が(1)～(27)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法で単離する化合物である、(33)～(38)のいずれか1項に記載の医薬組成物、

(40) 炎症性サイトカインがIL-1、TNF、IL-10又はIL-6である、(33)～(39)のいずれか1項に記載の医薬組成物、を提供する。

【0011】

なお、本発明において「ペプチド」とは、アミノ酸同士がペプチド結合により結合した化合物を指す。従って、アミノ酸が長鎖の、いわゆるポリペプチドや蛋白質もまた本発明のペプチドに含まれる。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明に使用されるTAK1としては、TAK1とTAB1の結合阻害に基づく化合物をスクリーニングする場合には、TAB1に結合する活性を有してさえいれば特に制限はない。配列番号：2に示すアミノ酸配列において1位のアミノ酸Metから579位アミノ酸のSerからなるアミノ酸配列を有する完全なTAK1はもちろんのこと、TAK1のキナーゼ活性を失っているTAK1であってもよい。

【0013】

TAK1は、配列番号：2に示すTAK1の1位のアミノ酸Metから303位のアミノ酸Gluからなるアミノ酸配列を有するTAK1の触媒ドメイン(catalytic domain)を含む領域にTAB1が結合することにより活性化される。本明細書において配列番号：2に示すTAK1の76位のアミノ酸Valから303位のアミノ酸Glnからなる

アミノ酸配列においてTAB1と結合することが開示されている。配列番号：2に示すTAK1の76位のアミノ酸Val から303位のアミノ酸Gln からなるアミノ酸配列を有するTAK1はキナーゼ活性を示さないが、TAB1との結合活性を有することから本発明において使用することができる。

【0014】

従って、本発明において使用するTAK1としては、配列番号：2において76位のアミノ酸Val から303位のアミノ酸Gln からなるアミノ酸配列を有し、かつ1位のアミノ酸Met から75位のアミノ酸Ile までのアミノ酸配列及び304位のアミノ酸Tyr に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1であってよい。

【0015】

TAK1は、TAB1との結合活性を有すれば、配列番号：2において76位のアミノ酸Val から303位のアミノ酸Gln までのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1であってよい。

【0016】

一方、TAK1のキナーゼ活性阻害に基づく化合物をスクリーニングする場合、TAK1としては、そのキナーゼ活性を有してさえいれば特に制限はない。

【0017】

使用されるTAK1としては、例えば、配列番号：2 に示すアミノ酸配列において1位のアミノ酸Met から579位アミノ酸のSer からなるアミノ酸配列を有し、且つTAK1の生物学的活性を有する完全なTAK1が挙げられる。TAK1の生物学的活性は、TAB1との結合活性及び活性化状態においてMAPKK に対するキナーゼ活性であることが明らかになっている。すなわち、TAK1はTAB1が結合することにより活性化して、キナーゼ活性を示す。

【0018】

さらに詳しくは、TAK1は活性化状態においてキナーゼ活性（リン酸化反応）を示し、そのキナーゼ活性によりMAPKK 、例えばMKK3 (Moriguchi, T. et al., J. Biol. Chem. (1996) 271, 13675-13679) 、MKK6 (Moriguchi, T. et al., J. B

iol. Chem. (1996) 271, 13675-13679)、又はXMEK2/SEK1(Shibuya, H. et al., Science(1996)272, 1179-1182)をリン酸化することによりMAPKKのキナーゼ活性を活性化する活性であることが明らかになっている。

【0019】

また、本発明に使用されるTAK1は、TAK1の生物学的活性を有し、且つ配列番号：2に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1であってよい。より具体的には、本発明に使用されるTAK1は、TAK1の生物学的活性を有する限り、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個のアミノ酸残基が置換したアミノ酸を有してよい。

【0020】

または、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～276個、より好ましくは1～10個のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸を有してよい。または、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個のアミノ酸残基が付加したアミノ酸を有してよい。

【0021】

配列番号：2に示すヒトTAK1のアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1として、例えば16位のアミノ酸GlyがSer、372位のアミノ酸HisがArg、400位のアミノ酸AlaがVal、403位のアミノ酸ThrがAla及び449位のアミノ酸ThrがAlaであるマウス由来のTAK1が挙げられる。

【0022】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、

Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)

実際に、TAK1は、配列番号：2 において1位のアミノ酸Met から303位のアミノ酸Gln までのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すことが明らかになっている。したがって、本発明に使用されるTAK1は、配列番号：2 において1位のアミノ酸Met から303位のアミノ酸Gln までのアミノ酸配列を有し、かつ304位のアミノ酸Tyr から579位のアミノ酸Ser までのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1であってよい。TAK1は、その生物学的活性有する限り、配列番号：2 において1位のアミノ酸Met から303位のアミノ酸Gln までのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAK1であってよい。

【0023】

また、TAK1のアミノ基側末端（N 末端）の少なくとも21個のアミノ酸残基が欠失することによってもTAK1の生物学的活性は活性化されるため、このようなTAK1を本発明において用いることも可能である。

【0024】

なお、配列番号：2 に示されるTAK1のアミノ酸配列において、1位のアミノ酸Metからアミノ酸位置579位のアミノ酸Serからなるアミノ酸配列を有するヒトTAK1ペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドphTAK1を保持する大腸菌は*Escherichia coli* JM109 (phTAK1) と命名され、平成8(1996)年7月19日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-5598として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0025】

本発明に使用されるTAB1としては、TKA1とTAB1の結合阻害に基づく化合物をスクリーニングする場合、TAK1に結合する活性を有してさえいれば特に制限はない。TAK1の生物学的活性を失っているものであってもよい。

【0026】

TAK1に結合する活性を有してさえいれば、配列番号：4 に示す1位のアミノ酸

Met から504位のアミノ酸Pro からなるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAB1であってよい。

【0027】

一方、TAK1のキナーゼ活性阻害に基づく化合物をスクリーニングする場合、TAB1はTAK1のキナーゼ活性を活性化する活性を有してさえいれば特に制限はない。

【0028】

使用されるTAB1としては、配列番号：4に示すアミノ酸配列において1位のアミノ酸Met から504位のアミノ酸Pro からなるアミノ酸配列を有し、且つTAB1の生物学的活性を有する完全なTAB1が挙げられる。TAB1の生物学的活性とは、TAK1に結合し、TAK1を活性化する活性であることが明らかになっている。

【0029】

さらに詳しくは、TAB1の生物学的活性とは、TAK1の1位のアミノ酸Met から303位のアミノ酸Glu からなるアミノ酸配列を有するTAK1の触媒ドメイン (catalytic domain) を含む領域に結合し、TAK1のMAPKK に対するキナーゼ活性を活性化させる活性であることが明らかになっている。

【0030】

また、使用されるTAB1は、TAB1の生物学的活性を有し、且つ配列番号：4に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAB1であってよい。より具体的には、本発明に使用されるTAB1は、TAB1の生物学的活性を有する限り、配列番号：4に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個のアミノ酸残基が置換したアミノ酸を有してよい。

【0031】

また、配列番号：4に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～436個、より好ましくは1～10個のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸を有してよい。または、配列番号：4に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個のアミノ酸残基が付加したアミノ酸を有してよい。本発明に使用されるTAB1はまた、上記アミ

ノ酸の置換、欠失及び/又は付加による修飾が同時になされていてもよい。

【0032】

TAB1は、配列番号：4において437位のアミノ酸Gln から504位のアミノ酸Pro までのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すことが明らかになっている。したがって、本発明に使用されるTAB1は、配列番号：4において437位のアミノ酸Gln から504位のアミノ酸Pro までのアミノ酸配列を有し、かつ4位のアミノ酸Met から436位のアミノ酸Asn までのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び/又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAB1であってよい。

【0033】

TAB1は、その生物学的活性有する限り、配列番号：4において437位のアミノ酸Gln から504位のアミノ酸Pro までのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び/又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAB1であってよい。

【0034】

配列番号：4に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び/又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するTAB1として、52位のアミノ酸Ser がArg であるTAB1や437位のアミノ酸Gln から504位のアミノ酸Pro までのアミノ酸配列を有するTAB1も挙げられる。

【0035】

なお、配列番号：4に示すTAB1のアミノ酸配列において、1位のアミノ酸Met から504位のアミノ酸Proからなるアミノ酸配列を有するヒトTAB1ペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドTAB1-f-4を保持する大腸菌は*Escherichia coli* DH5a (TAB1-f-4) と命名され、平成8(1996)年7月19日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-5599として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0036】

また、配列番号：4に示すTAB1のアミノ酸配列において、1位のアミノ酸Met から504位のアミノ酸Proからなり、かつ52位のアミノ酸SerがArgである上

記ヒトTAB1ペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドpBS-TAB1を保持する大腸菌は*Escherichia coli* HB101 (pBS-TAB1) と命名され、平成8(1996)年4月19日に工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託番号FERM BP-5508として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0037】

本発明に使用されるTAK1及び／又はTAB1は、由来する種、それらを産生する宿主及び／又は精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖付加の有無や糖鎖付加の位置、糖鎖の構造、リン酸化状態及び／又はジスルフィド結合の有無が異なる。しかしながら、本発明に好適に使用し得る限り、いかなる構造を有するものであってよいが、由来する種としてはヒトが好ましい。

【0038】

本発明に使用される上記蛋白質はまた、他のペプチドと融合した上記蛋白質であってよい。これら融合ペプチドを作製する方法は、すでに公知の手法を用いることができる。上記蛋白質との融合に付される他のペプチドとしては、本発明に有効に使用される限りいかなるペプチドであってよい。

【0039】

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulin の断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また例えば、ペプチドとしては、GST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。これらは市販されているものを用いることができる。

【0040】

本発明に使用される上記蛋白質はまた、それらをコードするDNAとハイブリダイズするDNAであって、かつそれらの生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNAによりコードされている蛋白質であってよい。

【0041】

本発明に使用されるTAK1をコードするDNAとしては、配列番号：1に示す塩基配列の183位の塩基Aから1919位の塩基Aからなる塩基配列が挙げられる。本発明に使用されるTAB1をコードするDNAとしては、配列番号：3に示す塩基配列の30位の塩基Aから1541位の塩基Gからなる塩基配列が挙げられる。

【0042】

本発明に使用される蛋白質をコードするDNAとしてはまた、各々配列番号：1又は3に示す塩基配列に対しハイブリダイズし、且つその生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNAであってもよい。本発明で使用される蛋白質をコードするDNAがハイブリダイズする条件としては、適度なストリンジェンシー条件であればよい。

【0043】

このようなハイブリダイズ条件としては、例えば低ストリンジェンシーな条件が挙げられる。低ストリンジェンシーな条件としては、例えば42℃、5×SSC、0.1% sodium dodecyl sulfate、50%ホルムアミドにより与えられる洗浄条件である。より好ましくは、高ストリンジェンシーな条件であるとよい。高ストリンジェンシーな条件としては、例えば60℃、0.1×SSC、0.1% sodium dodecyl sulfateにより与えられる洗浄条件である。ある蛋白質をコードする塩基配列に対し、適度なストリンジェンシー条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質がその蛋白質と同じ生物学的活性を有することはすでに知られている。

【0044】

本発明に使用されるTAK1又はTAB1をコードするDNAとしては、各々配列番号：1又は3に示す塩基配列を有するDNAであれば、いかなる由来のDNAであってもよい。このようなDNAとして、例えばゲノミックDNA、cDNA、及び合成DNAが挙げられる。これらは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ゲノミックライブラリーから得られたDNAであってもよいし、それらは市販のDNAライブラリーであってもよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YACベクター等いかなるものであってもよい。

【0045】

本発明に使用されるTAK1又はTAB1は、それら蛋白質をコードするDNAを用いて、後述のように遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え蛋白質として得ることができる。例えば、組換え蛋白質は、本明細書に記載された各々の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列を、それらを発現する細胞、組織、又は臓器からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明においては、このような組換え蛋白質を用いることができる。

【0046】

具体的には、本発明に使用される蛋白質を発現する細胞、組織、又は臓器から、その遺伝子をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 529 4-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0047】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて遺伝子のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成および増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit(CLONTECH製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

【0048】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。目的とするDNAが得られれば、これを発現ベクターへ組み込む。

【0049】

本発明に使用される蛋白質をコードするDNAは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ゲノミックライブラリーから得られたDNAであってよいし、それらは市販のDNAライブラリーであってよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YACベクター等いかなるものであってもよい。

【0050】

本発明に使用される蛋白質をコードするDNAは、以上に述べたDNAを市販のキットや公知の方法によって構築することができる。例えば、制限酵素による消化、リンカーの付加、開始コドン(ATG)及び／又は終始コドン(ATT、TGA又はTAG)の挿入等が挙げられる。

【0051】

本発明に使用される蛋白質を発現させるための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpGEX、pGEMEX、pMALp2が挙げられる。

【0052】

本発明に使用される蛋白質の発現ベクターには、例えばある蛋白質をコードするDNAを、発現ベクターの中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。プロモーター／エンハンサーとしては、哺乳動物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばEF1- α プロモーター／エンハンサー、 γ -アクチンプロモーター／エンハンサー、昆虫ウイルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えば多核体(ポリヘドリン)ウイルスプロモーター／エンハンサー、植物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばタバコモザイクウイルスプロモーター／エンハンサー、動物ウイルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えばSV40プロモーター／エンハンサー、ヒトCMVプロモーター／エンハンサー、酵母由

来のプロモーター／エンハンサー、例えばアルコール脱水素酵素プロモーター／エンハンサー、大腸菌由来のプロモーター／エンハンサー、例えばLac プロモーター／エンハンサー、Trpプロモーター／エンハンサー、Tacプロモーター／エンハンサーが挙げられる。

【0053】

例えば、SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0054】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0055】

本発明に使用されるTAK1又はTAB1の発現には、発現に用いられる宿主に適したシグナル配列を付加して使用してもよい。シグナル配列としては、例えば分泌蛋白質のシグナル配列が挙げられる。分泌蛋白質のシグナル配列としては、例えば哺乳動物由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばイムノグロブリンのシグナル配列が挙げられる。また分泌蛋白質のシグナル配列としては、大腸菌由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばOmpA、pelB (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) 等のペリプラズム分泌シグナル配列が挙げられる。

【0056】

このように作製した発現ベクターは、公知の方法により宿主に導入することができる。宿主への導入の方法としては、例えばエレクトロポレーション (EMBO J. (1982) 1, 841-845)、リン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467)、リポソーム法が挙げられる。

【0057】

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。さらに、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。

【0058】

本発明において使用される組換え蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。組換え蛋白質製造のための産生系は、*in vitro*および*in vivo*の産生系がある。*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0059】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr⁻ CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

【0060】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus)

属、例えばアスペルギウス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

【0061】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、例えば、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

【0062】

これらの細胞を、目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより組換え蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。このように遺伝子を導入した細胞に組換え蛋白質を産生させ、回収する。

【0063】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で組換え蛋白質を産生させ、回収する。

【0064】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0065】

例えば、目的とするDNAをヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から組換え蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される組換え蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994))

12, 699-702)。

【0066】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の組換え蛋白質を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【0067】

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の組換え蛋白質を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0068】

これらの動物又は植物に上記のように遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で組換え蛋白質を産生させ、回収する。前記のように発現、産生された組換え蛋白質は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する蛋白質の分離、精製は通常使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

【0069】

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、蛋白質を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0070】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Prot

ein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0071】

蛋白質は、公知の方法を用いて濃度を測定することができる。例えば、吸光度の測定又はブラッドフォード (Bradford) 法を用いればよい。

【0072】

本発明のスクリーニング方法に適用される被験試料は、例えばペプチド、精製若しくは粗精製タンパク質、合成化合物、微生物発酵物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物又は動物細胞抽出物あるいはそれらのライブラリーが挙げられる。

【0073】

これらの被験試料はTAK1とTAB1との結合を阻害又は抑制すると予想される化合物、TAK1のキナーゼ活性 (リン酸化反応) を阻害又は抑制すると予想される化合物、TAK1及びTAB1により生ずるTAK1のキナーゼ活性 (リン酸化反応) を阻害又は抑制すると予想される化合物、またはこれら化合物を含む試料である。

【0074】

本発明のスクリーニング方法により単離しうるこれらの化合物は、上述のようにTAK1、又はTAK1及びTAB1の活性を阻害又は抑制することにより、炎症性サイトカインのシグナル伝達の阻害又は抑制、炎症性サイトカインの産生の阻害又は抑制、炎症性サイトカインの生理活性の阻害又は抑制、炎症性刺激によるシグナル伝達の阻害又は抑制をもたらす。

【0075】

本発明において、炎症性サイトカインとは一般に炎症反応に係わるサイトカインを指し、具体的にはIL-1 (例えばIL-1 α 、IL-1 β)、TNF (例えばTNF α 、TNF β)、IL-6、IL-10、IL-4及びケモカインであるIL-8、MCP-1等を挙げることができる。

【0076】

本発明のスクリーニング方法の一つの態様は、TAK1、TAB1及び被験試料を接触させ、次いでTAK1とTAB1との結合の形成を検出し、TAK1とTAB1との結合の形成を阻害する化合物を選択することにより実施される。

【0077】

本発明において提供されるスクリーニング系は、*in vitro*のアッセイ系として行われる。*in vitro*のアッセイ系の一つの具体例は、非細胞系において行われる。具体的には、TAK1とTAB1の組み合わせにおいて、いずれか一方を支持体に結合させ、ここにもう一方と被験試料を加え、インキュベートをした後洗浄して支持体に結合した蛋白質に対するもう一方の蛋白質の結合を検出又は測定すればよい。

【0078】

本発明に使用される蛋白質は、それらを固有に発現する細胞、それらをコードするDNAを導入した細胞、それらをコードするDNAを導入した動物又は植物から産生される蛋白質を、精製した状態であるいは粗精製の状態で使用することができる。

【0079】

本発明に使用される蛋白質は、支持体に結合させて用いることができる。はじめに精製された又は粗精製されたTAK1又はTAB1のいずれか一つを支持体に結合させる。該蛋白質を支持体に結合させるには、標準的な方法で該蛋白質を支持体に固相化すればよい。蛋白質を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えばアガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。ビーズの場合、これらが充填されたカラム等を用いてもよい。プレートの場合、マルチウェルプレート（96穴マルチウェルプレート等）やバイオセンサーチップが挙げられる。

【0080】

蛋白質と支持体を結合させるには、化学結合、物理的な吸着等を利用する、通常用いられる方法を用いればよい。また、蛋白質を特異的に認識する抗体を予め支持体に結合せしめ、この抗体と蛋白質とを結合させることもできる。さらに、

アビジン/ビオチンを介して結合させることができる。

【0081】

TAK1とTAB1との結合は、通常緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、Tris緩衝液等が使用される。また、インキュベートの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが挙げられる。インキュベート後の洗浄は、蛋白質の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば界面活性剤を含む緩衝液が使用される。界面活性剤としては、例えば0.05%Tween 20が使用される。

【0082】

目的の化合物を選択するには、TAK1、TAB1及び被験試料を適切な条件下でインキュベートし、次いで洗浄することにより、特異的な結合と非特異的な結合を分離することができる。そして、TAK1とTAB1との結合状態を評価すればよい。

【0083】

目的の化合物を選択する際に、支持体に結合させるタンパクはTAK1、TAB1のいずれでもよい。すなわち、TAK1を支持体に結合させる場合には、TAK1を固相化後TAB1と被験試料をあらかじめ混合したもの、または被験試料添加後にTAB1を添加しても良い。また、TAB1を支持体に固相化する場合には、同様にTAK1と被験試料とをあらかじめ混合したもの、または被験試料添加後にTAK1を添加しても良い。以上の順序で添加したTAK1、TAB1及び被験試料を適切な条件下でインキュベーションし、TAK1とTAB1との結合状態を評価することができる。

【0084】

本発明のスクリーニング方法において、被験試料を蛋白質に接触させる群と共にコントロール群を設置してもよい。コントロール群としては、被験試料を含まない陰性コントロール群又は陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

【0085】

本発明において結合した蛋白質を検出又は測定する際、単に結合した蛋白質を検出するだけでもよいし、又は結合した蛋白質を定量的に測定してもよい。これらの場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた結果、被験試料を

含む群で得られた結果及び／又は陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、目的の化合物を検出することができる。

【0086】

また、これらの結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、目的の化合物の活性を定量的に測定することもできる。定量的に測定する場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた数値と被験試料を適用した群で得られた数値を比較することにより、目的の化合物を検出することができる。陰性対照と比較して、得られた数値が減少していれば、被験試料が目的の化合物を含むと判定することができる。

【0087】

また、定量的に測定する場合、TAK1とTAB1との結合を阻害することがわかっている化合物を既知量含む陽性コントロール群で得られた数値により作成された標準曲線を元に定量することができる。結合した蛋白質が多い場合、蛋白質の結合を阻害する化合物の活性が低く、一方結合した蛋白質が少ない場合、その蛋白質の結合を阻害する化合物の結合阻害活性が強いことが推測される。

【0088】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは蛋白質-蛋白質間の相互作用を微量の蛋白質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明で使用される蛋白質の結合を評価することが可能である。

【0089】

すなわち、TAK1とTAB1との組み合わせの一方を固定化したセンサーチップに、組み合わせのもう一方の蛋白質を接触させ、固定化した一方の蛋白質に結合する蛋白質を共鳴シグナルの変化として検出しようとするものである。

【0090】

具体的には以下のように行えばよい。初めにセンサーチップCM5（Biosensor製

) を活性化して TAK1 と TAB1 との組み合わせの一方をセンサーチップ上に固定化する。すなわち、EDC / NHS 水溶液 (200mM EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbonate hydrochloride) , 50mM NHS (N-hydroxysuccinimide)) によりセンサーチップを活性化した後、HBSバッファー (10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05% Tween20) によりセンサーチップを洗浄する。

【0091】

次に HBSバッファーに溶解した適量の相互作用を有する蛋白質をセンサーチップに接触させ、固定化する。HBSバッファーによりセンサーチップを洗浄後、エタノールアミン溶液 (1M ethanolamine hydrochloride, pH8.5) によりセンサーチップ上の残存活性基をブロックする。再び HBSバッファーによりセンサーチップを洗浄し結合評価に用いる。

【0092】

次に HBSバッファーに溶解した適量の蛋白質を注入する。このときにセンサーチップに固定化された蛋白質に結合する相互作用を有する蛋白質の量は共鳴シグナル値の増加として観察される。

【0093】

さらに、上記結合評価系において、一方の蛋白質に相互作用を有するもう一方の蛋白質に引き続いて被験試料を注入する。また被験試料を注入する群と共に、コントロール群を設置してもよい。コントロール群としては被験試料を含まない陰性コントロール群又は陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

【0094】

結合した蛋白質は共鳴シグナル値の変化量として定量的に測定することができる。この場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた結果、被験試料を含む群で得られた結果及び／又は陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、目的の化合物を検出、決定することができる。

【0095】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、いずれかの蛋白質を標識し、結合した蛋白質の標識を利用することができる。

【0096】

例えば、前述のスクリーニング方法において、被験試料とともに一方の蛋白質に接触させるもう一方の蛋白質をあらかじめ標識しておき、被験試料とともにインキュベートした後、洗浄して結合している蛋白質をその標識により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させた一方の蛋白質に被験試料と標識したもう一方の蛋白質を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合している蛋白質の標識を検出又は測定すればよい。

【0097】

本発明で使用される蛋白質は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質、ビオチン／アビジン等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

【0098】

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、いずれかの蛋白質を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、被験試料ともう一方の標識された蛋白質をプレートに加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群を置き、これらをインキュベートする。インキュベートの後、洗浄し結合した蛋白質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を決定することができる。

【0099】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、TAK1とTAB1との組み合わせにて、一方の蛋白質を特異的に認識する一次抗体を用いることができる。

【0100】

例えば、一方の蛋白質に被験試料とともにもう一方の蛋白質を接触させ、被験試料とともにインキュベートした後、洗浄して結合している蛋白質をその蛋白質を特異的に認識する一次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させた一方の蛋白質に被験試料ともう一方の蛋白質を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合している蛋白質をその蛋白質を特異的に認識する一次抗体により検出又は測定すればよい。一次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

【0101】

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、いずれかの蛋白質を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、被験試料ともう一方の蛋白質をプレートに加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群を置き、これらをインキュベートする。

【0102】

インキュベートの後、洗浄し被験試料と共に加えた蛋白質に対する抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄しその蛋白質を特異的に認識する一次抗体により蛋白質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合、液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計より検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を決定することができる。

【0103】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、本発明に使用される蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体を用いるこ

とができる。

【0104】

例えば、前述のスクリーニング方法において、いずれかの蛋白質に被験試料とともにもう一方の蛋白質を接触させ、被験試料とともにインキュベートした後、洗浄して結合している蛋白質をその蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させた一方の蛋白質に被験試料ともう一方の蛋白質を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合している蛋白質をその蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体により検出又は測定すればよい。一次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

【0105】

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、いずれかの蛋白質を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、被験試料と他のペプチドと融合したもう一方の蛋白質をプレートに加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び／又は陽性コントロールを置き、これらをインキュベートする。

【0106】

インキュベートの後、洗浄し被験試料と共に加えた蛋白質と融合した他のペプチドに対する抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄しその蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体により蛋白質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を決定することができる。

【0107】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、本発明で用される蛋白質を特異的に認識する一次抗体及び該一次抗体を特異的に認識する

二次抗体を用いることができる。

【0108】

例えば、いずれかの蛋白質に被験試料とともにもう一方の蛋白質を接触させ、被験試料とともにインキュベートした後、洗浄して結合している蛋白質をその蛋白質を特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させたいいずれかの蛋白質に被験試料ともう一方の蛋白質を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合している蛋白質をその蛋白質を特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定すればよい。二次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

【0109】

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、いずれかの蛋白質を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、被験試料ともう一方の蛋白質をプレートに加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群を置き、これらをインキュベートする。

【0110】

インキュベートの後、洗浄し被験試料と共に加えた蛋白質と融合した他のペプチドに対する一次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に認識する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、その蛋白質を特異的に認識する一次抗体を特異的に認識する二次抗体により蛋白質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合、液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合、蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を選択することができる。

【0111】

本発明において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識す

る二次抗体を用いることができる。

【0112】

例えば、前述のスクリーニング方法において、いずれかの蛋白質に被験試料とともにもう一方の蛋白質を接触させ、被験試料とともにインキュベートした後、洗浄して結合している蛋白質をその蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させた一方の蛋白質に被験試料ともう一方の蛋白質を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合している蛋白質をその蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定すればよい。二次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

【0113】

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、いずれかの蛋白質を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、被験試料と他のペプチドと融合したもう一方の蛋白質をプレートに加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群を置き、これらをインキュベートする。

【0114】

インキュベートの後、洗浄し被験試料と共に加えた蛋白質と融合した他のペプチドに対する一次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に認識する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、その蛋白質と融合した他のペプチドを特異的に認識する一次抗体を特異的に認識する二次抗体により蛋白質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を決定することができる。

【0115】

より詳しくは、本発明は特に好ましくはELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) により次のようにして行うことができる。すなわち、他のペプチド、例えば6×Hisと融合したTAK1を固相化バッファー (0.1 M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH 9.6) により希釈する。96穴のイムノプレート (Nunc製) の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え4℃で一晩インキュベートする。

【0116】

洗浄バッファー (PBS に0.05% Tween20 となるよう調製したもの) で3回各穴を洗浄後、PBSに溶解した5% BSA (SIGMA 製) 溶液200 μl を加え、4℃で一晩ブロッキングする。

【0117】

次に洗浄バッファーで3回各穴を洗浄し、希釈バッファー (1% BSA、0.5% Tween20、PBS) で希釈した他のペプチド、例えばFLAGと融合したTAB1と被験試料を適量加え、室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファーで各穴を3回洗浄し、希釈バッファーで3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したマウス抗FLAG M2抗体 (IBI製) を100 μl 各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。

【0118】

洗浄バッファーで各穴を3回洗浄し、希釈バッファーで 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (ZYMED製) を 100 μl 各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファーで5回各穴を洗浄し、発色溶液 (基質バッファー; 50 mM NaHCO_3 、10mM MgCl_2 、pH9.8に 1 mg/mlの濃度に溶解したp-フェニルフォスフェート; SIGMA製) を 100 μl 各穴に加え、室温で反応させた後に 405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Model3550、BIO-RAD 製) を用いて測定する。これらの結果を、陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を決定することができる。

【0119】

なお、本発明の抗体を利用した検出または測定においては、二次抗体に代えてプロテインGやプロテインAを用いることも可能である。

【0120】

本発明のスクリーニング方法は、High Throughput Screening (HTS) を使用することができる。具体的には、ブロッキングまでを手作業で行い、その後の反応はロボットによって行うことでオートメーション化し、High Throughput screeningを実現することができる。

【0121】

すなわち、他のペプチド、例えば6×Hisと融合したTAK1を固相化バッファー（0.1 M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH9.6）により希釈する。96穴のイムノプレート（Nunc製）の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え4℃で一晩インキュベートする。

【0122】

洗浄バッファー（PBS に 0.05% Tween20 となるよう調製したもの）で3回各穴を洗浄後、PBSに溶解した5% BSA（SIGMA 製）溶液200 μl を加え、4℃で一晩ブロッキングする。

【0123】

次に、例えばBiomek2000 HTS system(Beckman製)にブロッキング済みのイムノプレートをセットしてシステムのコントロールプログラムを実行する。この際、分注機としてはBiomek 2000分注機(Beckman製)あるいはMultipipette96穴同時分注器(Sagian製)を用いることでイムノプレート各穴への溶液の分注や溶液の除去を行うことができる。また、イムノプレートの各穴の洗浄にはEL404マイクロプレートウォッシャー(Bio Tek製)を用いることができる。また、吸光度の測定にはSPECTRAMax250プレートリーダー(Molecular Devices製)を用いることができる。

【0124】

プログラムは以下の操作をおこなうよう設定する。すなわち洗浄バッファーで3回各穴を洗浄し、被験試料と希釈バッファー（1% BSA、0.5% Tween20、PBS）で希釈した他のペプチド、例えばMBP（マルトース結合蛋白質）と融合したTAB1を適量加える。同時に被験試料を含まない陰性コントロール群及び陽性コントロールを置き、これらを室温で1時間インキュベートする。

【0125】

洗浄バッファーで各穴を3回洗浄し、希釈バッファーで5000倍に希釈したウサギ抗MBP抗血清（New England Biolabs製）を100 μ l各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファーで各穴を3回洗浄し、希釈バッファーで5000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（TAGO製）を100 μ l各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。

【0126】

洗浄バッファーで5回各穴を洗浄し、発色溶液（基質バッファー；50 mM NaHCO₃、10mM MgCl₂、pH9.8に1 mg/mlの濃度に溶解したp-ニトロフェニルフォスフェート；SIGMA製）を100 μ l各穴に加え、室温で反応させた後に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー、Biomekプレートリーダー（Beckman / Molecular Devices製）を用いて測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば目的の化合物を同定することができる。

【0127】

本発明において使用される抗体として、市販の抗体や市販のキットに含まれる抗体を用いることもできるし、公知の手段を用いて得られるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いることもできる。

【0128】

モノクローナル抗体は、所望の感作抗原を使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0129】

具体的には、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原は、その由来となる動物種に制限されないが、実際に本発明で使用するペプチドの由来となる哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のものが好ましい。これらのうち、特にヒト由来の感作抗原が好ましい。例えば、ヒトTAK1又はヒトTAB1を感作抗原として使用する場合、それらの塩基配列及びアミノ酸配列は本明細書に開示される遺伝子配列を用いて得ることができる。また、上記蛋白質との融合に付される他のペプチド

を感作抗原として用いる場合、それらのペプチドを化学的に合成するか、遺伝子工学的手法により得ることができる。

【0130】

感作抗原として使用される蛋白質あるいはペプチドは、その全長を使用してもよいし、またその断片も用いることができる。断片としては、例えばC末端断片やN末端断片が挙げられる。

【0131】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

【0132】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0133】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中で所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0134】

ここで、ポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗

体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

【0135】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。

【0136】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、既に公知の種々の細胞株が好適に使用される。

【0137】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0138】

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0139】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0140】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温した PEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度の PEG溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによ

て目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0141】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0142】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウィルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質あるいはペプチドやそれらの発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、ペプチドへの結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688）。

【0143】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質あるいはペプチド、それらの発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて本発明に使用される蛋白質あるいはペプチドに対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0144】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0145】

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0146】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子 (oncogene) により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0147】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる。例えば、組換え型抗体は、抗体遺伝子をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明には、この組換え型抗体を用いることができる (例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。

【0148】

本発明で使用される抗体は、所望の結合活性を有するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる。

【0149】

前記のように発現、産生された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常のタンパク質で正在されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

【0150】

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0151】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

【0152】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0153】

上記で得られた抗体の濃度測定又は活性確認は、公知の方法、例えばELISA、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。

【0154】

上記のように得られた一次抗体又は二次抗体は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。

蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンが挙げられる。これらの標識物質として市販のものを入手して、公知の方法によって標識化を行えばよい。

【0155】

また、TAK1とTAB1との結合の形成の検出は、これら蛋白質の結合に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化によっても検出及び／又は測定することができる。TAK1とTAB1との結合により生じる生物学的活性に応答して活性化するレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、HIS3遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT)、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP) 遺伝子等を用いることができる。

【0156】

細胞で発現されるTAK1とTAB1は他のペプチドとの融合蛋白質であってよい。これらの蛋白質と融合に付される他のペプチドとは、本発明のスクリーニング方法で使用されうる限りいかなるペプチドであってよいが、好ましくは転写調節因子である。

【0157】

例えば、DNAに結合してあるレポーター遺伝子の転写を活性化することが知られているヘテロダイマーからなる転写調節因子の各々のサブユニットとTAK1及びTAB1を融合させたDNAを構築し、それらを発現ベクターに含めて細胞に導入する。TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物が被験試料に含まれていない場合、TAK1とTAB1が融合したサブユニットがヘテロダイマーを形成し、そしてそのヘテロダイマーからなる転写調節因子がDNAに結合してレポーター遺伝子が活性化する。

【0158】

また、TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物が被験試料に含まれている場合、TAK1とTAB1との結合が阻害され、その結果転写調節因子のサブユニットがヘテロダイマーを形成できず、レポーター遺伝子の転写が誘導されない。レポーター遺伝子の発現量の変化を調べることにより、目的の化合物を検出又は測定することができる。このような系においてレポーター遺伝子の発現量の変化を調べる場合、ツーハイブリッドシステム (two hybrid system、Fields, S., and Sternglan

z, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を使用することができる。

【0159】

ツーハイブリッドシステムは通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販のツーハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれもCLONTECH製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene製) が挙げられる。

【0160】

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、TAK1をコードする遺伝子とLexAのDNA結合ドメインをコードする遺伝子とを連結し発現ベクターを作製する。例えば、配列番号：2に示される全長又は1位のアミノ酸から418位のアミノ酸からなるTAK1をコードする遺伝子を酵母ツーハイブリッド発現プラスミドpBTM116 (Vojtek, A.B., et al., Cell (1993) 74, 205-214) にフレームが一致するように挿入し、発現プラスミドを構築する。

【0161】

次に、全長もしくは配列番号：4において1位のアミノ酸から504位のアミノ酸からなるTAB1をコードする遺伝子とGAL4転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。発現ベクターは、例えば、TAB1をコードする遺伝子を酵母ツーハイブリッド発現プラスミドpGAD10 (CLONTECH製) にフレームが一致するように挿入することで構築できる。

【0162】

LexA結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節されるHIS3遺伝子を組み込んだ酵母L40株を各ツーハイブリッド発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートすると蛋白質の相互作用が認められたときのみ酵母の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができ、目的の化合物をスクリーニングすることができる。

【0163】

本発明において提供されるスクリーニング系の他の態様は、TAK1、又はTAK1及

びTAB1により生じるTAK1のキナーゼ活性を指標として実施される。

【0164】

TAK1のキナーゼ活性を指標としてスクリーニングを実施するには、TAK1のみ、又はTAK1及びTAB1を用いたin vitroキナーゼ測定系を用いればよい。TAK1はそのN末端の22残基のアミノ酸を欠失することにより、構成的にキナーゼ活性を示す。従って、N末端の22残基のアミノ酸を欠失したTAK1をCOS細胞等の動物細胞、大腸菌等の細菌細胞又は酵母細胞等において発現させ、被験試料を加えてインキュベートする。その後、抗TAK1抗体等を用いて分離したTAK1に ^{32}P -ATPと共にMKK6等のTAK1の基質タンパクを加え、キナーゼ反応を行いその活性を検出又は測定する。キナーゼ反応後基質タンパクのリン酸化に伴い取り込まれた ^{32}P -ATPの量を測定することでTAK1のキナーゼ活性を評価することができ、被験試料を含まない陰性コントロールの値と比較することで、TAK1のキナーゼ活性を直接阻害する化合物を同定できる。

【0165】

TAK1とTAB1を用いたin vitroキナーゼ測定系としては、文献「Moriguchi, T., et al., J. Biol. Chem. 271: 13675-13679 (1996)」に記載されている方法等が挙げられる。例えば、COS細胞等の動物細胞、大腸菌又は酵母等において発現させたTAK1ならびにTAB1を被験試料と共にin vitroでインキュベートした後、抗TAK1抗体等を用いて分離したTAK1に ^{32}P -ATPと共にMKK6等の基質タンパクを加え、キナーゼ反応を行いその活性を検出又は測定する。キナーゼ反応後に基質タンパクのリン酸化に伴い取り込まれた ^{32}P -ATPの量を測定することでTAK1のキナーゼ活性を評価することができ、被験試料を含まない陰性コントロールの値と比較することで、TAK1のキナーゼ活性を阻害する化合物を同定できる。

【0166】

TAK1のキナーゼ活性を指標としたスクリーニング方法は、ハイスループットスクリーニング (High Throughput Screening; HTS) にも使用することができる。具体的には、各試料の添加・混合並びに各反応をロボットを用いて行うことでオートメーション化し、基質タンパクのリン酸化の程度を Scintillation proximity assay 法 (Bothworth, N. and Towers, P., Nature, 341: 167-168, 1989)

で検出することで、ハイスループットスクリーニングを実現することができる。

【0167】

すなわち、COS細胞等の動物細胞、大腸菌又は酵母において発現させたTAK1ならびにTAB1を被験試料と共に、96穴のマイクロプレートの各穴に加えインキュベートする。続いて上記反応液に、 ^{32}P -ATP と共に基質タンパク、例えば MKK6 を加え、キナーゼ反応を行う。次に、抗 MKK6 抗体を各穴に加え、続いてプロテインA又は種特異的な抗体をコーティングしたSPAビーズ (Amersham社製) を各穴に加える。インキュベーションの後、MicroBeta scintillation counter (Wallac社製) を用いて基質タンパクに取り込まれた放射活性を測定する。また、ビオチン化した基質タンパクを用いた場合には、ストレプトアビジンをコーティングしたSPAビーズを用いることで測定することが可能となる。これらの方法により得られた結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば、TAK1のキナーゼ活性を阻害する化合物を含む被験試料を同定することができる。

【0168】

本発明において提供されるスクリーニング系のさらなる他の態様は、細胞を用いた *in vitro* のアッセイ系において行われる。すなわち、TAK1及びTAB1を発現する細胞に被験試料を導入及び／又は接触させ、次いでTAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定し、次いで該生物学的活性を減少させる化合物を選択することにより、目的の化合物を得ることができる。

【0169】

上記の方法において、使用される蛋白質は使用する細胞内において発現される。後述の実施例において、TAK1とTAB1との結合が阻害されることにより、炎症性サイトカインのシグナル伝達が阻害され、サイトカインネットワークによる他の炎症性サイトカインの産生が阻害されることが明らかになった。したがって、TAK1、又はTAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定することにより、目的とする炎症性サイトカインのシグナル伝達の阻害又は抑制、それによる炎症性サイトカインの産生の阻害又は抑制、炎症性サイトカインの生理活性の阻害又は抑制、あるいは炎症性刺激によるシグナル伝達の阻害又は抑制をもたらす化合物のスクリーニングが可能となる。

【0170】

TAK1、又はTAK1及びTAB1を発現する細胞は、好ましくは天然にこれら全てを発現しない細胞に、本明細書に記載されたそれらをコードするDNAを導入することにより遺伝子工学的に作製することができる。

【0171】

TAK1、又はTAK1及びTAB1を発現する細胞は本発明に使用し得る限りいかなる細胞を用いることができる。本発明に使用し得る細胞としては、原核細胞と真核細胞が挙げられる。原核細胞としては、細菌細胞等が挙げられる。真核細胞としては、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞等が挙げられる。

【0172】

これらの細胞株に、本発明で使用する蛋白質をコードする遺伝子を導入し、被験試料を加え、炎症性サイトカインのシグナル伝達、炎症性サイトカインの産生、炎症性サイトカインの生理活性、あるいは炎症性刺激によるシグナル伝達等を反映した作用を検出又は測定すればよい。被験試料の導入及び接触は、被験試料を細胞培養液中へ添加することで行えばよい。

【0173】

TAK1、又はTAK1及びTAB1とを介して伝達される生物学的活性としては、例えば、炎症性サイトカインの生物学的活性、炎症メディエーター誘導活性又はレポーター遺伝子の発現量変化等が挙げられる。

【0174】

炎症性サイトカインとして、具体的にIL-1（例えばIL-1 α 、IL-1 β ）、TNF（例えばTNF α 、TNF β ）、IL-6等を挙げることができる。IL-1の生物学的活性は、抗体産生の増強、T細胞及び／又はB細胞の活性化、サイトカインネットワークによる他のサイトカインIL-6、IL-2、IFN- δ 等の産生誘導、急性期蛋白の誘導、発熱、血管内皮細胞の活性化、白血球の浸潤、コラゲナーゼ及び／又はコラーゲン産生等である。従って、炎症性サイトカインとしてIL-1の生物学的活性を検出するには、これらの作用を検出又は測定すればよい。

【0175】

TNFの生物学的活性は、T細胞やマクロファージの活性化、サイトカインネット

ワークによる他のサイトカインIL-1、IL-6、IL-8等の産生誘導、アポトーシス誘導、コラゲナーゼ及び／又はコラーゲン産生、プロスタグランジン産生、等である。したがって、炎症性サイトカインとしてTNFの生物学的活性を検出するにはこれらの作用を検出又は測定すればよい。IL-6の生物学的活性は、急性期蛋白の誘導、抗体産生の増強、造血幹細胞の増加、神経系細胞の分化促進等である。したがって、炎症性サイトカインとしてIL-6の生物学的活性を検出するにはこれらの作用を検出又は測定すればよい。

【0176】

炎症性サイトカインの生物学的活性を検出するためにこれらの作用を検出又は測定するためには、これまでにこれらの作用を発現することが知られている細胞株等を用いることができる。例えば、サイトカイン誘導作用を検出又は測定するには、T細胞株によって産生されるサイトカイン量をELISAやPCRによって定量することができる。

【0177】

TAK1、又はTAK1及びTAB1を介した生物学的活性として、プロスタグランジン等の炎症メディエーター誘導活性を検出及び／又は測定するには、マクロファージ系細胞株を用い、市販のキット等により定量することができる。抗体産生増強作用を検出又は測定するには、B細胞株を用いELISAで抗体産生量を測定することができる。T細胞活性化作用を検出又は測定するには、T細胞株を用いてFACS等による細胞表面マーカーの解析等で評価することができる。

【0178】

TAK1、又はTAK1及びTAB1を介した生物学的活性は、該生物学的活性に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化によっても検出及び／又は測定することができる。TAK1とTAB1との結合により生じる生物学的活性に応答して活性化するレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、HIS3遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT)、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP) 遺伝子等を用いることができる。また、レポーター遺伝子を使用する場合、その発現量を検出及び／又は測定するためには、ノーザン解析を行うこともできる。

【0179】

単球・マクロファージ細胞においてはIL-1あるいはLPS等の炎症性の刺激によりIL-6やIL-1等の炎症性サイトカインの発現が上昇する。従って、TAK1、TAK1及びTAB1を介して伝達される生物学的活性を検出及び／又は測定するために、TAK1及び／又はTAB1をそれらの細胞で発現させた後、IL-1あるいはLPS等の炎症性の刺激を加え、炎症性サイトカインのシグナル伝達、それによる炎症性サイトカインの産生、炎症性サイトカインの生理活性、炎症性刺激によるシグナル伝達、及び／又は炎症性サイトカインの発現への影響を検討することもできる。

【0180】

ここで本発明において、炎症性の刺激とは、生体組織の障害の原因となる細菌感染、外傷又は熱、寒冷、放射線若しくは電気など物理的刺激、化学物質、あるいは生体免疫系の異常など、炎症反応を引き起こすものを指す。炎症性の刺激としては、例えばIL-1、LPS等が挙げられる。

【0181】

所望の蛋白質を発現するための発現ベクターは、発現ベクターの適切な制限酵素部位に各々をコードする遺伝子を挿入し、それぞれ発現プラスミドを構築すればよい。例えば、293細胞に各発現プラスミドを導入した細胞及び挿入遺伝子を含まない発現ベクターを導入したコントロール細胞にIFN- β 遺伝子由来のNF- κ B 応答性エレメントによって制御されるルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子構築物 (p55IgkLuc; Fujita, T., et al., Gene, Dev., (1993) 7, 1354-1363) を導入し、各々10ng/mlのIL-1またはIL-1を含まない培地中で培養する。その細胞抽出物中のルシフェラーゼ活性を測定する。

【0182】

被験試料を加えない細胞では、IL-1添加によりルシフェラーゼ活性は増加するのに対し、被験試料を加えた細胞においてはルシフェラーゼ活性が増加しない。すなわち、被験試料に含まれる目的の化合物がIL-1刺激によるレポーター遺伝子の発現量増加を阻害する。このようにして、レポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができ、目的の化合物をスクリーニングすることができる。

【0183】

本発明はまた、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤、炎症性サイトカイン産生阻害剤、及び抗炎症剤に関する。本発明さらに、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する、炎症性サイトカインの生理活性の阻害剤、炎症性刺激によるシグナル伝達の阻害剤を提供する。

【0184】

TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物とは、本明細書に記載されたTAK1の生物学的活性を阻害する化合物を意味する。TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、例えばTAK1とTAB1との結合を阻害する化合物、TAK1のキナーゼ活性を阻害する化合物、TAK1の基質の拮抗を阻害する化合物等が挙げられる。

【0185】

TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物とは、TAK1とTAB1との相互作用を阻害する化合物を指す。TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物は、例えばTAK1に対して特異的に結合する化合物やTAB1に特異的に結合する化合物が挙げられる。これらの化合物は、各々標的に特異的に結合することによって、標的と結合する蛋白質と競合することにより標的と結合する蛋白質を隔離する化合物であってよく、またTAK1とTAB1との結合部位に特異的に結合することにより、TAK1とTAB1の結合を阻害する化合物であってよい。

【0186】

TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物は、TAK1又はTAB1に特異的に結合する化合物であり、例えば標的への結合能を有しているが、TAK1に対する活性化能やTAB1に対する活性化能を欠失した化合物であってよい。TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物は、より好ましくはTAK1におけるTAB1結合部位、又はTAB1におけるTAK1結合部位に特異的に結合する化合物であってよい。

【0187】

このようなTAK1とTAB1との結合を阻害する化合物として、蛋白質、ペプチド又は化学的に合成された化合物が挙げられ、例えばTAK1若しくはTAB1の変異体、TAK1若しくはTAB1の部分ペプチド、TAK1若しくはTAB1に対する抗体、又はTAK1、TAB1若しくはその両者に特異的に結合する化合物、TAK1若しくはTAB1のアンチセン

スオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0188】

TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物は、TAK1とTAB1との結合を阻害する活性を有する限りその構造や由来等は特に限定されない。

【0189】

TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物の具体例としては、後述の実施例に記載されたTAK1-DNが挙げられる。TAK1-DNは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列において77位のアミノ酸Gluから303位のアミノ酸Glnまでからなるアミノ酸配列を有する。TAK1-DNはTAB1との結合能は有するが、TAK1のキナーゼ活性を欠失している。そのため、TAK1-DNはTAB1と結合するが、TAK1のシグナル伝達をおこさない。そして、正常なTAK1がTAB1と結合することを阻害する。したがって、TAK1-DNはTAK1のシグナル伝達を阻害する化合物の一具体例として挙げることができる。

【0190】

TAK1とTAB1との結合を阻害する化合物を得るためには、TAK1とTAB1を用いたスクリーニング系を用いればよい。TAK1とTAB1を用いたスクリーニング系としては、本明細書に記載されているELISA又はツーマイブリッドシステムを用いたスクリーニング系等が挙げられる。

【0191】

TAK1のキナーゼ活性を阻害する化合物は、TAK1の活性化を阻害する化合物であってもよいし、TAK1の触媒機能を阻害する化合物であってもよい。TAK1の活性化を阻害する化合物としては、例えば上記のようなTAK1とTAB1との結合を阻害する化合物、あるいはTAB1との結合に伴い起こるTAK1の活性化を阻害する化合物であってもよい。

【0192】

これらの化合物は、各々標的に特異的に結合することによって、標的と結合する蛋白質と競合することにより標的と結合する蛋白質を隔離する化合物であってよく、またTAK1とTAB1との結合部位あるいはTAB1のTAK1活性化領域に特異的に結合することにより、TAK1とTAB1の結合あるいはそれに伴うTAK1の活性化を阻害す

る化合物であってよい。

【0193】

また、TAK1のキナーゼ活性を阻害する化合物は、TAK1の触媒領域に作用し、活性化TAK1のリン酸化能を阻害する化合物であってもよい。例えばリン酸化の際の触媒作用を阻害するもの、あるいは基質との相互作用を阻害する化合物であってもよい。これらの化合物は、各々標的に特異的に結合することによって、標的と結合する蛋白質と競合することにより標的と結合する蛋白質を隔離する化合物であってよく、またTAK1の触媒領域あるいは基質タンパクとの結合領域に結合、あるいは基質タンパクのTAK1結合領域、又はTAK1によりリン酸化を受ける領域に特異的に結合することにより、TAK1と基質タンパクの結合あるいはそれに伴うTAK1によるリン酸化反応を阻害する化合物であってよい。このようなTAK1のキナーゼを阻害する化合物を得るためには、上述のin vitroキナーゼ測定系を用いればよい。

【0194】

このようなTAK1のシグナル伝達を阻害する化合物として、蛋白質、ペプチド又は化学的に合成された化合物が挙げられ、例えばTAK1若しくはTAB1の変異体、TAK1若しくはTAB1の部分ペプチド、TAK1若しくはTAB1に対する抗体、又はTAK1、TAB1若しくはその両者に特異的に結合する化合物、TAK1若しくはTAB1のアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、TAK1のシグナル伝達を阻害する活性を有する限りその構造や由来等は特に限定されない。TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、その構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も包含する。

【0195】

後述の実施例に示されるように、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、炎症性の刺激（LPS）によるIL-1、TNF及びIL-6等の炎症性サイトカインの産生を阻害し、また、炎症性サイトカイン（IL-1）によるIL-6の産生を阻害することが明らかになった。したがって、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、これらの炎症性サイトカインのシグナル伝達、それによる炎症性サイトカインの産生、炎症性サイトカインの生理活性、炎症性刺激によるシグナル伝達、及び／又は炎症

性の刺激を抑制することにおいて有用である。IL-1、TNF及びIL-6等のサイトカインは炎症反応に関与することが知られ、炎症性サイトカインと総称される。

【0196】

これらの炎症性サイトカインは、敗血症、関節リウマチ、喘息、腎炎、肝炎、肺炎、など様々な病態の進行に関与していると考えられることから、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を含む医薬組成物はこれらの疾患の治療及び／又は予防を目的として有用に使用される。

【0197】

さらに炎症性の刺激やサイトカインネットワークによる炎症性サイトカインの産生を抑制したり、炎症性サイトカインの生理作用を阻害することにより、炎症が低減され、炎症作用が抑制されることが知られている。すなわち、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は炎症性の刺激及び／又は炎症性サイトカインの生理作用を抑制することにより、抗炎症効果を有する。したがって、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は抗炎症剤として有用である。TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は炎症を伴う疾患において、抗炎症効果を発揮することを期待して使用され得る。

【0198】

本発明の炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤、炎症性サイトカインの産生阻害剤、抗炎症剤又は医薬組成物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マンタビビ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

【0199】

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。

【0200】

例えば、本発明の炎症性サイトカイン産生阻害剤又は抗炎症剤を生理学的に認められる単体、香味剤、賦形剤、ビーヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに

一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0201】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸の様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。

【0202】

調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状単体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水の様なベヒクルにより、通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0203】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50と併用してもよい。

【0204】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0205】

本発明の炎症性サイトカイン産生阻害剤又は抗炎症剤の投与量は、症状により

差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0206】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0207】

【実施例】

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0208】

【実施例1】 TAK1-DN発現ベクターの構築とトランスジェニックマウスの作製
ヒトTAK1とヒトTAB1の特異的結合を阻害することで、LPSや炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害できることを証明するために、ドミナント・ネガティブ・インヒビター（dominant negative inhibitor）として作用するTAK1-DN 発現ベクターを作製した。

【0209】

TAK1-DN はTAK1のTAB1結合部位である配列番号：2に示すアミノ酸配列の77位のアミノ酸Glu から303 位のアミノ酸Gln までからなるアミノ酸配列を有している。TAK1-DN をコードする遺伝子断片をph-TAK1（特開平9-163990参照）を鋳型DNA として用いてPCR 法により増幅した。すなわち、制限酵素Eco RI認識部位及び開始コドンATG を含むセンスプライマーTAK1S（配列番号：5）及び制限酵素EcoRI 認識部位及びストップコドンを含むアンチセンスプライマーTAK1AS（配列番号：6）を用い、TAK1-DN をコードするDNA 断片を増幅した。

【0210】

得られたPCR産物を制限酵素EcoRIにより消化し、H-2L^dプロモーターを含有す

る動物細胞発現ベクターpLG-1 (図1参照) のEcoRI認識部位に挿入してTAK1-DNトランスジェニックベクターpLG-TAKDNを作製した。

【0211】

DNAの導入は、ノマルスキー微分干渉装置のついた倒立顕微鏡 (LEICA製) 下において、マニピュレーターに接続した微小ガラスピペットを用いマイクロインジェクション法により行った。すなわち、C57BL/6Jの受精卵の雄性前核にPBS 1 μ lあたり約500分子のTAK1-DNをコードするDNA分子を含む溶液を2 μ l注入した。導入遺伝子断片は、pLG-TAKDNを制限酵素XhoIによって消化し、アガロースゲル電気泳動により分離、精製したものを用いた。

【0212】

DNAを注入した操作卵は、精管結紮雄マウスとの交配により偽妊娠を誘起したICR系雌マウス (レシピエントマウス) の卵管内に移植した。移植19日後に自然分娩または帝王切開により仔マウスを得た。帝王切開の場合は、別に準備しておいたICR系雌マウスを里親として仔マウスを哺育させた。

【0213】

3~4週齢にて、各出産児の尾からDNAを採取し、PCR法を用いて導入配列の保持につき試験した。分析用のDNAは以下のようにして調製した。すなわち、尾の2 cm切片を溶解液1 ml (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) で55℃で一晩かけて溶解させた。フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行ったのち、イソプロパノール沈殿を行いDNAを抽出した。得られたDNAを100 μ lのTE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) に溶解した。

【0214】

DNA 100 ngを鋳型として用い、PCRプライマーRb-g101 (配列番号: 7) 及びTA12A (配列番号: 8) を用い、PCRを行い分析した。分析した22匹のマウスのうち、3匹の雄及び2匹の雌が新たな遺伝子を保持していることが判明した。

【0215】

図2は、ジェノミックサザン分析の結果を示す。すなわち、EcoRIで消化したゲノムDNA 50 μ gを0.7%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンHy

bond N+ (アマシャム製) に転写した。これを [α - 32 P] dCTPで標識したTAK1-DN DNA 50 ngをプローブとして用い、定法に従いハイブリダイズさせた。その結果TAK1-DNトランスジェニックマウスにのみ目的のバンドが検出され、導入遺伝子の存在が確認された。

【0216】

上記にて創出されたマウスのうちの一系統(雌)とC57BL/6J雄マウスとの間の交配によって、第1世代の子孫を得、上記と同様に導入遺伝子の有無を解析した。その結果、25匹のF₁マウスより11匹が導入遺伝子を受け継いでいた。

【0217】

図3は、F₁マウスについて実際TAK1-DNのmRNAが発現していることを確認したものである。すなわち、F₁マウスの肝臓および腎臓から全RNAを調製し、30 μ gを1%のホルマリン変性アガロースゲルで電気泳動した。これをナイロンメンブレンHybond N+ (アマシャム製) に転写し、[α - 32 P] dCTPで標識したTAK1-DN DNA 50 ngをプローブとして用い、定法に従いハイブリダイズさせた。その結果、F₁マウスにのみ目的のバンドが検出され、導入遺伝子の発現が確認された。

【0218】

トランスジェニックマウスの継代および維持には、体外受精の手法を用いた。すなわち、C57BL6/J雌マウスに5 IUのPMSG(妊馬血清性性腺刺激ホルモン、帝国臓器製薬製)を注射し、その48時間後に同量のhCG(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、三共製薬製)を注射し、F₁雄マウスと交配させた。hCG注射16~17時間後に雄マウスの尾部より精子を採取し、4 mg/ml BSAを含むTYH培地(1 mlあたりNaCl 6.97 mg, KCl 0.36 mg, CaCl₂ · 2H₂O 0.25 mg, KH₂PO₄ 0.16 mg, MgSO₄ · 7H₂O 0.29 mg, NaHCO₃ 2.11 mg, ピルビン酸ナトリウム0.11 mg, ストレプトマイシン 50 μ g, ペニシリン75 μ g, グルコース 1.0 mg, pH 7.0)で37℃、1.5時間インキュベートした。インキュベートが終わる直前にC57BL6/J雌マウスから採卵し、オイル下の4 mg/ml BSAを含むTYH培地に入れた。続いて精子を卵を含む培地に添加し、37℃、4~6時間インキュベートした。こうして得られた受精卵を100 mM EDTAおよび4 mg/ml BSAを含むwhitten's培地(1 mlあたりNaCl 5.14 mg, KCl 0.36 mg, KH₂PO₄ 0.16 mg, MgSO₄ · 7H₂O 0.29 mg, NaHCO₃ 1.90 mg, 乳酸カルシウム

・5水和物0.53 mg, ストレプトマイシン50 μ g, ペニシリン80 μ g, グルコース 1.0 mg, 60 %乳酸ナトリウム3.7 mg) に移し、精子を取り除いた後、雌マウスの卵管内へ移植した。

【0219】

〔実施例2〕 TAK1-DN発現腹腔マクロファージのサイトカイン産生能

TAK1-DN発現トランスジェニックマウスより調製した腹腔マクロファージを用い、IL-1及びリポポリサッカロイド (LPS、シグマ社製) の反応性について検討した。

【0220】

すなわち、TAK1-DN発現トランスジェニックマウス (TAK1-DN Tgm) 又は同週齢のC57BL/6マウス (野生型マウス) の腹腔に氷冷したPBSに0.36%となるようにクエン酸ナトリウムを添加した溶液10mlを注入し、30秒間マッサージした後、液を回収した。回収した溶液を遠心し、沈殿した細胞をFBS (GIBCO-BRL製) を10%になるように添加したRPMI1640 (GIBCO-BRL製) に再懸濁し、1ウェル当たり5 \times 10⁴個の細胞を播種した。37℃にて2時間培養した後、培養液で洗浄することで浮遊細胞を除去し、培養プレートに吸着した細胞を腹腔マクロファージとして用いた。

【0221】

上記により調製した腹腔マクロファージにLPSを10 μ g/ml、又はIL-1 α (Genzyme製) を10ng/mlとなるように加え、さらに24時間培養した。培養上清を回収後、LPSで刺激したマクロファージ由来培養上清中に含まれるIL-1 β 量、及びIL-1 α で刺激したマクロファージ由来培養上清中に含まれるIL-6量をそれぞれELISAキット (Genzyme製) を用いて測定した。

【0222】

その結果を、図4及び図5に示す。図4ではLPS刺激によるTNF、IL-1 α 、およびIL-6の産生誘導を評価したが、TAK1-DN Tgm由来マクロファージでは野生型マウス由来マクロファージに比べて、有意にこれら炎症性サイトカインの産生誘導が抑制された。また、図5に示した様に、IL-1刺激によるIL-6の産生誘導を調べると、同様にTAK1-DN Tgm由来マクロファージでは野生型マウス由来マクロ

ファージに比べて、有意にIL-6の産生誘導が抑制された。以上の結果より、TAK1とTAB1の結合阻害により、炎症性の刺激（LPS）による炎症性サイトカインの産生抑制、および炎症性サイトカインネットワークによるサイトカインの産生抑制が示された。

【0223】

【実施例3】 TAK1-DN発現腹腔マクロファージのLPSおよびIL-1 α 刺激におけるI κ B α の分解

上記で調製したTAK1-DN Tgm由来および野生型マウス由来マクロファージをLPSまたはIL-1刺激を加え、I κ B α のプロテアソームでの分解を経時的変化（0、30、60分）を評価した。具体的には、腹腔マクロファージを 1×10^6 個ずつ96ウェルプレートで培養した。この際、プロテアソーム阻害剤MG132(40 μ M)の存在または非存在下で、LPS(1 μ g/ml)またはIL-1 α (10ng/ml)を添加し、30分、60分後に細胞を回収した。

【0224】

細胞はPBS(-)で洗浄後、リシスバッファ（lysis buffer）を加えて細胞溶解物（cell lysate）を調製した。約 2×10^5 個相当分をそれぞれ9%SDS-PAGEにてゲル電気泳動を行った。分離された蛋白はニトロセルロース膜へブロッティングし、抗-I κ B α 抗体（SantaCruz製）を1次抗体として1時間30分インキュベーションし、洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗ウサギ抗体を二次抗体として反応させ、ECL(アマシャム製)によって反応産物を検出した。その結果、図6に示す様にコントロールである野生型マウス由来マクロファージではLPSおよびIL-1刺激によって急激なI κ B α の分解が観察され、NF κ Bの活性化が誘導されていることを示唆している。一方、TAK1-DN Tgm由来マクロファージではLPSおよびIL-1刺激を加えても顕著なI κ B α の分解は観察されず、NF κ Bの活性化が抑制されていることを示唆している。本実施例にて、TAK1のシグナル伝達を阻害することにより有意にNF κ Bの活性化を阻害しうることが分子生物学的に明らかになった。

【0225】

【参考例1】

配列番号：2 に示す TAK1 ペプチドの 77 位の Glu から 303 位の Gln からなるペプチド (TAK1-DN) が動物細胞内において TAK1 ペプチドと TAB1 ペプチドとの結合を阻害し、さらに TAK1 ペプチドの活性化を阻害し得るか否かを、TAB1 ペプチドと TAK1 ペプチドを用いた動物細胞ツーハイブリッド系 (two-hybrid system, Dang et al., (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 954-962) を用いて解析した。

【0226】

まず、全長の TAK1 ならびに TAK1-DN をコードする遺伝子と GAL4 DNA 結合ドメイン (GAL4-BD) をコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製した。全長の TAK1 をコードする遺伝子は酵母ツーハイブリッド発現プラスミド pBTMHu11F (Shibuya H. et al., (1996) 272, 1179-1182) を制限酵素 EcoRI および PstI により消化することにより調製し、続いて GAL4-BD 遺伝子を含む発現ベクター pM (CLONTECH 製) EcoRI/PstI 部位に連結し、動物細胞ツーハイブリッド発現プラスミド pM-TAK1 とした。

【0227】

次に、TAK1-DN をコードする遺伝子は制限酵素 EcoRI 認識部位を付加したセンスプライマー-DNTAK5' (配列番号：9) ならびに制限酵素 PstI 認識部位を付加したアンチセンスプライマー-DNTAK3' (配列番号：10) を用い、プラスミド pBTMHu11F を鋳型 DNA とし PCR により増幅した。制限酵素 EcoRI および PstI により消化した後 pM ベクターに連結し、動物細胞ツーハイブリッド発現プラスミド pM-TAK1DN とした。

【0228】

次に、TAB1 ペプチドのカルボキシ端 68 アミノ酸残基からなる TAB1C68 をコードする遺伝子と単純ヘルペスウイルスの VP16 タンパク由来転写活性化ドメイン (VP16-AD) をコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製した。TAB1C68 をコードする遺伝子は酵母ツーハイブリッド発現プラスミド pGAD-TAB1 (Shibuya H. et al., (1996) 272, 1179-1182) を制限酵素 EcoRI で消化することにより調製し、続いて VP16-AD をコードする遺伝子を含む発現ベクター pVP16 (CLONTECH 製) EcoRI 部位に連結し、動物細胞ツーハイブリッド発現プラスミド pVP16-C68 とした。

【0229】

レポータープラスミドは5個の連続したGAL4結合部位を持ち、その下流にクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を持つpG5CAT (CLONTECH製) のCAT をコードする遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したpG5-Luc を用いた。

【0230】

CHO 細胞 (5×10^4 個/ 各穴) を一夜培養後、PBS で洗浄し、500ng のGAL4-BD 融合タンパク発現プラスミド (pM, pM-TAK1, pM-TAK1DNのいずれか)、500ng のVP16-AD 融合タンパク発現プラスミド (pVP16, pVP16-C68のいずれか)、100ng のレポータープラスミドpG5-Luc および50ngのpRL-SV40 (SV40プロモーターの下流にRenilla のルシフェラーゼ遺伝子を含む、Promega 製) の各プラスミドと10 μ lのLIPOFECTOAMINE (GIBCO-BRL 製) との混合物を加え、5 時間培養し遺伝子導入を行った。

【0231】

さらに72時間培養した後、それぞれの細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性をDual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega 製) を用いて測定した。すなわち、PBS で細胞を洗浄後、キット添付のPassive Lysis Bufferを250 μ l 加え、室温にて15分間インキュベートし、その内の20 μ l を細胞抽出液としてアッセイに供した。なお、遺伝子導入効率はpRL-SV40によるRenilla のルシフェラーゼ活性の測定値にて補正を行った。結果は図7に示す。

【0232】

pM-TAK1 とpVP16-C68 の組合せと同様にpM-TAK1DN とpVP16-C68 の組合せにおいてもルシフェラーゼ活性の上昇が確認され、TAK1DNが全長のTAK1と同様にTAB1 と結合することが明らかになった。

【0233】

【発明の効果】

本発明により、TAK1がIL-1、TNF又はIL-6等の炎症性サイトカインのシグナル伝達に関与すること、及びTAK1のシグナル伝達を阻害する化合物がIL-1、TNF及びIL-6等の炎症性サイトカインの産生を阻害することが明らかにされた。したが

って、本発明のスクリーニング方法は、炎症性サイトカインの産生を阻害する化合物を選択するために有用である。また、本発明のTAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は、炎症性サイトカインのシグナル伝達の阻害剤、炎症性サイトカインの産生の阻害剤、炎症性サイトカインの生理活性の阻害剤、炎症性刺激によるシグナル伝達の阻害剤として有用である。また、TAK1のシグナル伝達を阻害する化合物は抗炎症剤として有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

<120> Method for screening signal transduction inhibitors of
inflammatory cytokines

<130> C1-005

<160> 10

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 2656

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (183)..(1919)

<400> 1

gtcgagatcc attgtgctct aaagacggct gtggccgctg cctctacccc cgccacggat 60

cgccgggtag taggactgcg cggctccagg ctgagggtcg gtccggaggc gggtagggcgc 120

gggtctcacc cggattgtcc gggtaggcacc gttcccggcc ccaccgggcg ccgcgaggga 180

tc atg tct aca gcc tct gcc gcc tcc tcc tcc tcc tcg tct tcg gcc 227

Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala

1

5

10

15

ggt gag atg atc gaa gcc cct tcc cag gtc ctc aac ttt gaa gag atc 275

Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu Ile

20

25

30

gac tac aag gag atc gag gtg gaa gag gtt gtt gga aga gga gcc ttt 323

Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly Ala Phe

35

40

45

gga gtt gtt tgc aaa gct aag tgg aga gca aaa gat gtt gct att aaa 371

Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val Ala Ile Lys

50

55

60

caa ata gaa agt gaa tct gag agg aaa gcg ttt att gta gag ctt cgg 419

Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile Val Glu Leu Arg

65

70

75

cag tta tcc cgt gtg aac cat cct aat att gta aag ctt tat gga gcc 467
Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Tyr Gly Ala
80 85 90 95

tgc ttg aat cca gtg tgt ctt gtg atg gaa tat gct gaa ggg ggc tct 515
Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu Tyr Ala Glu Gly Gly Ser
100 105 110

tta tat aat gtg ctg cat ggt gct gaa cca ttg cca tat tat act gct 563
Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala
115 120 125

gcc cac gca atg agt tgg tgt tta cag tgt tcc caa gga gtg gct tat 611
Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr
130 135 140

ctt cac agc atg caa ccc aaa gcg cta att cac agg gac ctg aaa cca 659
Leu His Ser Met Gln Pro Lys Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro
145 150 155

cca aac tta ctg ctg gtt gca ggg ggg aca gtt cta aaa att tgt gat 707
Pro Asn Leu Leu Leu Val Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp
160 165 170 175

ttt ggt aca gcc tgt gac att cag aca cac atg acc aat aac aag ggg 755
Phe Gly Thr Ala Cys Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly
180 185 190

agt gct gct tgg atg gca cct gaa gtt ttt gaa ggt agt aat tac agt 803

Ser Ala Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser

195

200

205

gaa aaa tgt gac gtc ttc agc tgg ggt att att ctt tgg gaa gtg ata 851

Glu Lys Cys Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile

210

215

220

acg cgt cgg aaa ccc ttt gat gag att ggt ggc cca gct ttc cga atc 899

Thr Arg Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile

225

230

235

atg tgg gct gtt cat aat ggt act cga cca cca ctg ata aaa aat tta 947

Met Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu

240

245

250

255

cct aag ccc att gag agc ctg atg act cgt tgt tgg tct aaa gat cct 995

Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp Pro

260

265

270

tcc cag cgc cct tca atg gag gaa att gtg aaa ata atg act cac ttg 1043

Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr His Leu

275

280

285

atg cgg tac ttt cca gga gca gat gag cca tta cag tat cct tgt cag 1091

Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr Pro Cys Gln

290

295

300

tat tca gat gaa gga cag agc aac tct gcc acc agt aca ggc tca ttc 1139

Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser Thr Gly Ser Phe

305	310	315	
atg gac att gct tct aca aat acg agt aac aaa agt gac act aat atg 1187			
Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys Ser Asp Thr Asn Met			
320	325	330	335
gag caa gtt cct gcc aca aat gat act att aag cgc tta gaa tca aaa 1235			
Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile Lys Arg Leu Glu Ser Lys			
	340	345	350
ttg ttg aaa aat cag gca aag caa cag agt gaa tct gga cgt tta agc 1283			
Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser			
	355	360	365
ttg gga gcc tcc cat ggg agc agt gtg gag agc ttg ccc cca acc tct 1331			
Leu Gly Ala Ser His Gly Ser Ser Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser			
	370	375	380
gag ggc aag agg atg agt gct gac atg tct gaa ata gaa gct agg atc 1379			
Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile			
	385	390	395
gcc gca acc aca ggc aac gga cag cca aga cgt aga tcc atc caa gac 1427			
Ala Ala Thr Thr Gly Asn Gly Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp			
400	405	410	415
ttg act gta act gga aca gaa cct ggt cag gtg agc agt agg tca tcc 1475			
Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser			
	420	425	430

agt ccc agt gtc aga atg att act acc tca gga cca acc tca gaa aag 1523

Ser Pro Ser Val Arg Met Ile Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys

435

440

445

cca act cga agt cat cca tgg acc cct gat gat tcc aca gat acc aat 1571

Pro Thr Arg Ser His Pro Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn

450

455

460

gga tca gat aac tcc atc cca atg gct tat ctt aca ctg gat cac caa 1619

Gly Ser Asp Asn Ser Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln

465

470

475

cta cag cct cta gca ccg tgc cca aac tcc aaa gaa tct atg gca gtg 1667

Leu Gln Pro Leu Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val

480

485

490

495

ttt gaa cag cat tgt aaa atg gca caa gaa tat atg aaa gtt caa aca 1715

Phe Glu Gln His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr

500

505

510

gaa att gca ttg tta tta cag aga aag caa gaa cta gtt gca gaa ctg 1763

Glu Ile Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu

515

520

525

gac cag gat gaa aag gac cag caa aat aca tct cgc ctg gta cag gaa 1811

Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu

530

535

540

cat aaa aag ctt tta gat gaa aac aaa agc ctt tct act tac tac cag 1859
His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln

545

550

555

caa tgc aaa aaa caa cta gag gtc atc aga agt cag cag cag aaa cga 1907
Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg

560

565

570

575

caa ggc act tca tgattctctg ggaccgttac attttgaaat atgcaaagaa 1959
Gln Gly Thr Ser

579

agactttttt ttttaaggaaa ggaaaacctt ataatgacga ttcattgagt ttagcttttt 2019

ggcgtgttct gaatgccaac tgcctatatt tgctgcattt ttttcattgt ttattttcct 2079

tttctcatgg tggacataca attttactgt ttcattgcat aacatggtag catctgtgac 2139

ttgaatgagc agcactttgc aacttcaaaa cagatgcagt gaactgtggc tgtatatgca 2199

tgctcattgt gtgaaggcta gcctaacaga acaggaggta tcaaactagc tgctatgtgc 2259

aaacagcgtc cattttttca tattagaggt ggaacctcaa gaatgacttt attcttgtat 2319

ctcatctcaa aatattaata atttttttcc caaaagatgg tatataccaa gttaaagaca 2379

gggtattata aatttagagt gattggtggt atattacgga aatacggaa ctttagggat 2439

agttccgtgt aagggccttg atgccagcat ccttggatca gtactgaact cagttccatc 2499

cgtaaaatat gtaaaggtaa gttgcagctg ctctatttaa tgaaagcagt tttaccggat 2559

tttgtttagac taaaatttga ttgtgataca ttgaacaaaa tggaactcat tttttttaag 2619

gagtaaagat tttctttiaga gcacaatgga tctcgac 2656

<210> 2

<211> 579

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ser	Thr	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly
1				5					10					15	

Glu	Met	Ile	Glu	Ala	Pro	Ser	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Ile	Asp
			20					25					30		

Tyr	Lys	Glu	Ile	Glu	Val	Glu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly
		35					40					45			

Val	Val	Cys	Lys	Ala	Lys	Trp	Arg	Ala	Lys	Asp	Val	Ala	Ile	Lys	Gln
		50				55					60				

Ile	Glu	Ser	Glu	Ser	Glu	Arg	Lys	Ala	Phe	Ile	Val	Glu	Leu	Arg	Gln
65					70					75				80	

Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Tyr Gly Ala Cys
85 90 95

Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu
100 105 110

Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala
115 120 125

His Ala Met Ser Trp Cys Leu Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu
130 135 140

His Ser Met Gln Pro Lys Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro
145 150 155 160

Asn Leu Leu Leu Val Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe
165 170 175

Gly Thr Ala Cys Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser
180 185 190

Ala Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu
195 200 205

Lys Cys Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr
210 215 220

Arg Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met
225 230 235 240

Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu Pro
245 250 255

Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp Pro Ser
260 265 270

Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr His Leu Met
275 280 285

Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr Pro Cys Gln Tyr
290 295 300

Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser Thr Gly Ser Phe Met
305 310 315 320

Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys Ser Asp Thr Asn Met Glu
325 330 335

Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu
340 345 350

Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu
355 360 365

Gly Ala Ser His Gly Ser Ser Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu
370 375 380

Gly Lys Arg Met Ser Ala Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala

385 390 395 400

Ala Thr Thr Gly Asn Gly Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu

405 410 415

Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser

420 425 430

Pro Ser Val Arg Met Ile Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro

435 440 445

Thr Arg Ser His Pro Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly

450 455 460

Ser Asp Asn Ser Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu

465 470 475 480

Gln Pro Leu Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val Phe

485 490 495

Glu Gln His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr Glu

500 505 510

Ile Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu Asp

515 520 525

Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu His

530 535 540

Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Gln
545 550 555 560

Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg Gln
565 570 575

Gly Thr Ser
579

<210> 3

<211> 1560

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (30)..(1541)

<400> 3

gaattcgtgg cccgcagggt tcctccaag atg gcg gcg cag agg agg agc ttg 53

Met Ala Ala Gln Arg Arg Ser Leu

5

ctg cag agt gag cag cag cca agc tgg aca gat gac ctg cct ctc tgc 101

Leu Gln Ser Glu Gln Gln Pro Ser Trp Thr Asp Asp Leu Pro Leu Cys

10

15

20

cac ctc tct ggg gtt ggc tca gcc tcc aac cgc agc tac tct gct gat 149

His	Leu	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Ser	Tyr	Ser	Ala	Asp	
25					30					35					40	
ggc aag ggc act gag agc cac ccg cca gag gac agc tgg ctc aag ttc																197
Gly	Lys	Gly	Thr	Glu	Ser	His	Pro	Pro	Glu	Asp	Ser	Trp	Leu	Lys	Phe	
				45					50					55		
agg agt gag aac aac tgc ttc ctg tat ggg gtc ttc aac ggc tat gat																245
Arg	Ser	Glu	Asn	Asn	Cys	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Phe	Asn	Gly	Tyr	Asp	
			60						65					70		
ggc aac cga gtg acc aac ttc gtg gcc cag cgg ctg tcc gca gag ctc																293
Gly	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Phe	Val	Ala	Gln	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Leu	
			75					80						85		
ctg ctg ggc cag ctg aat gcc gag cac gcc gag gcc gat gtg cgg cgt																341
Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Asn	Ala	Glu	His	Ala	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Arg	
			90					95						100		
gtg ctg ctg cag gcc ttc gat gtg gtg gag agg agc ttc ctg gag tcc																389
Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser	
105					110					115				120		
att gac gac gcc ttg gct gag aag gca agc ctc cag tcg caa ttg cca																437
Ile	Asp	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Pro	
				125					130					135		
gag gga gtc cct cag cac cag ctg cct cct cag tat cag aag atc ctt																485
Glu	Gly	Val	Pro	Gln	His	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Tyr	Gln	Lys	Ile	Leu	

140	145	150	
gag aga ctc aag acg tta gag agg gaa att tcg gga ggg gcc atg gcc			533
Glu Arg Leu Lys Thr Leu Glu Arg Glu Ile Ser Gly Gly Ala Met Ala			
155	160	165	
gtt gtg gcg gtc ctt ctc aac aac aag ctc tac gtc gcc aat gtc ggt			581
Val Val Ala Val Leu Leu Asn Asn Lys Leu Tyr Val Ala Asn Val Gly			
170	175	180	
aca aac cgt gca ctt tta tgc aaa tcg aca gtg gat ggg ttg cag gtg			629
Thr Asn Arg Ala Leu Leu Cys Lys Ser Thr Val Asp Gly Leu Gln Val			
185	190	195	200
aca cag ctg aac gtg gac cac acc aca gag aac gag gat gag ctc ttc			677
Thr Gln Leu Asn Val Asp His Thr Thr Glu Asn Glu Asp Glu Leu Phe			
205	210	215	
cgt ctt tcg cag ctg ggc ttg gat gct gga aag atc aag cag gtg ggg			725
Arg Leu Ser Gln Leu Gly Leu Asp Ala Gly Lys Ile Lys Gln Val Gly			
220	225	230	
atc atc tgt ggg cag gag agc acc cgg cgg atc ggg gat tac aag gtt			773
Ile Ile Cys Gly Gln Glu Ser Thr Arg Arg Ile Gly Asp Tyr Lys Val			
235	240	245	
aaa tat ggc tac acg gac att gac ctt ctc agc gct gcc aag tcc aaa			821
Lys Tyr Gly Tyr Thr Asp Ile Asp Leu Leu Ser Ala Ala Lys Ser Lys			
250	255	260	

cca atc atc gca gag cca gaa atc cat ggg gca cag ccg ctg gat ggg 869
Pro Ile Ile Ala Glu Pro Glu Ile His Gly Ala Gln Pro Leu Asp Gly
265 270 275 280

gtg acg ggc ttc ttg gtg ctg atg tcg gag ggg ttg tac aag gcc cta 917
Val Thr Gly Phe Leu Val Leu Met Ser Glu Gly Leu Tyr Lys Ala Leu
285 290 295

gag gca gcc cat ggg cct ggg cag gcc aac cag gag att gct gcg atg 965
Glu Ala Ala His Gly Pro Gly Gln Ala Asn Gln Glu Ile Ala Ala Met
300 305 310

att gac act gag ttt gcc aag cag acc tcc ctg gac gca gtg gcc cag 1013
Ile Asp Thr Glu Phe Ala Lys Gln Thr Ser Leu Asp Ala Val Ala Gln
315 320 325

gcc gtc gtg gac cgg gtg aag cgc atc cac agc gac acc ttc gcc agt 1061
Ala Val Val Asp Arg Val Lys Arg Ile His Ser Asp Thr Phe Ala Ser
330 335 340

ggt ggg gag cgt gcc agg ttc tgc ccc cgg cac gag gac atg acc ctg 1109
 Gly Gly Glu Arg Ala Arg Phe Cys Pro Arg His Glu Asp Met Thr Leu
 345 350 355 360

cta gtg agg aac ttt ggc tac ccg ctg ggc gaa atg agc cag ccc aca 1157
Leu Val Arg Asn Phe Gly Tyr Pro Leu Gly Glu Met Ser Gln Pro Thr
365 370 375

ccg agc cca gcc cca gct gca gga gga cga gtg tac cct gtg tct gtg 1205
Pro Ser Pro Ala Pro Ala Ala Gly Gly Arg Val Tyr Pro Val Ser Val

380

385

390

cca tac tcc agc gcc cag agc acc agc aag acc agc gtg acc ctc tcc 1253
Pro Tyr Ser Ser Ala Gln Ser Thr Ser Lys Thr Ser Val Thr Leu Ser

395

400

405

ctt gtc atg ccc tcc cag ggc cag atg gtc aac ggg gct cac agt gct 1301
Leu Val Met Pro Ser Gln Gly Gln Met Val Asn Gly Ala His Ser Ala

410

415

420

tcc acc ctg gac gaa gcc acc ccc acc ctc acc aac caa agc ccg acc 1349
Ser Thr Leu Asp Glu Ala Thr Pro Thr Leu Thr Asn Gln Ser Pro Thr

425

430

435

440

tta acc ctg cag tcc acc aac acg cac acg cag agc agc agc tcc agc 1397
Leu Thr Leu Gln Ser Thr Asn Thr His Thr Gln Ser Ser Ser Ser Ser

445

450

455

tct gac gga ggc ctc ttc cgc tcc cgg ccc gcc cac tcg ctc ccg cct 1445
Ser Asp Gly Gly Leu Phe Arg Ser Arg Pro Ala His Ser Leu Pro Pro

460

465

470

ggc gag gac ggt cgt gtt gag ccc tat gtg gac ttt gct gag ttt tac 1493
Gly Glu Asp Gly Arg Val Glu Pro Tyr Val Asp Phe Ala Glu Phe Tyr

475

480

485

cgc ctc tgg agc gtg gac cat ggc gag cag agc gtg gtg aca gca ccg 1541

Arg Leu Trp Ser Val Asp His Gly Glu Gln Ser Val Val Thr Ala Pro

490

495

500

tagggcagcc ggaggaatg

1560

<210> 4

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Gln Arg Arg Ser Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gln Pro Ser

5

10

15

Trp Thr Asp Asp Leu Pro Leu Cys His Leu Ser Gly Val Gly Ser Ala

20

25

30

Ser Asn Arg Ser Tyr Ser Ala Asp Gly Lys Gly Thr Glu Ser His Pro

35

40

45

Pro Glu Asp Ser Trp Leu Lys Phe Arg Ser Glu Asn Asn Cys Phe Leu

50

55

60

Tyr Gly Val Phe Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Arg Val Thr Asn Phe Val

65

70

75

80

Ala Gln Arg Leu Ser Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Leu Asn Ala Glu

85

90

95

His Ala Glu Ala Asp Val Arg Arg Val Leu Leu Gln Ala Phe Asp Val

100

105

110

Val Glu Arg Ser Phe Leu Glu Ser Ile Asp Asp Ala Leu Ala Glu Lys

115

120

125

Ala Ser Leu Gln Ser Gln Leu Pro Glu Gly Val Pro Gln His Gln Leu

130

135

140

Pro Pro Gln Tyr Gln Lys Ile Leu Glu Arg Leu Lys Thr Leu Glu Arg

145

150

155

160

Glu Ile Ser Gly Gly Ala Met Ala Val Val Ala Val Leu Leu Asn Asn

165

170

175

Lys Leu Tyr Val Ala Asn Val Gly Thr Asn Arg Ala Leu Leu Cys Lys

180

185

190

Ser Thr Val Asp Gly Leu Gln Val Thr Gln Leu Asn Val Asp His Thr

195

200

205

Thr Glu Asn Glu Asp Glu Leu Phe Arg Leu Ser Gln Leu Gly Leu Asp

210

215

220

Ala Gly Lys Ile Lys Gln Val Gly Ile Ile Cys Gly Gln Glu Ser Thr

225

230

235

240

Arg Arg Ile Gly Asp Tyr Lys Val Lys Tyr Gly Tyr Thr Asp Ile Asp
245 250 255

Leu Leu Ser Ala Ala Lys Ser Lys Pro Ile Ile Ala Glu Pro Glu Ile
260 265 270

His Gly Ala Gln Pro Leu Asp Gly Val Thr Gly Phe Leu Val Leu Met
275 280 285

Ser Glu Gly Leu Tyr Lys Ala Leu Glu Ala Ala His Gly Pro Gly Gln
290 295 300

Ala Asn Gln Glu Ile Ala Ala Met Ile Asp Thr Glu Phe Ala Lys Gln
305 310 315 320

Thr Ser Leu Asp Ala Val Ala Gln Ala Val Val Asp Arg Val Lys Arg
325 330 335

Ile His Ser Asp Thr Phe Ala Ser Gly Gly Glu Arg Ala Arg Phe Cys
340 345 350

Pro Arg His Glu Asp Met Thr Leu Leu Val Arg Asn Phe Gly Tyr Pro
355 360 365

Leu Gly Glu Met Ser Gln Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ala Ala Gly
370 375 380

Gly Arg Val Tyr Pro Val Ser Val Pro Tyr Ser Ser Ala Gln Ser Thr
385 390 395 400

Ser Lys Thr Ser Val Thr Leu Ser Leu Val Met Pro Ser Gln Gly Gln

405

410

415

Met Val Asn Gly Ala His Ser Ala Ser Thr Leu Asp Glu Ala Thr Pro

420

425

430

Thr Leu Thr Asn Gln Ser Pro Thr Leu Thr Leu Gln Ser Thr Asn Thr

435

440

445

His Thr Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Gly Leu Phe Arg Ser

450

455

460

Arg Pro Ala His Ser Leu Pro Pro Gly Glu Asp Gly Arg Val Glu Pro

465

470

475

480

Tyr Val Asp Phe Ala Glu Phe Tyr Arg Leu Trp Ser Val Asp His Gly

485

490

495

Glu Gln Ser Val Val Thr Ala Pro

500

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ccggaattcc accatggagc ttcggcagtt atcc

34

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

ccggaattcc tactgacaag gatactgt

28

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gtacttcagc acagtttttag agaac

25

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ggttgcattgc tgtgaaga

18

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

cggaattcga gctccggcag tgcgcg

27

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

aactgcaggc tactgacaag gatactgtaa

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、トランスジェニックマウス作成に用いたTAK1-DN発現ベクターの構造を模式的に示した図である。

【図 2】

図 2 は、TAK1-DN発現ベクターが挿入されたトランスジェニックマウスのファウンダーのDNAのサザン分析結果を示す。

【図 3】

図 3 は、TAK1-DN発現ベクターが挿入されたトランスジェニックマウスのF1世代のmRNAのノーザン分析結果を示す。

【図 4】

図 4 は、TAK1-DN発現トランスジェニックマウス由来腹腔マクロファージからのLPS刺激によるTNF、IL-1 β 、およびIL-6の産生誘導の分析結果を示す。

【図 5】

図 5 は、TAK1-DN発現トランスジェニックマウス由来腹腔マクロファージからのIL-1 α 刺激によるIL-6の産生誘導の分析結果を示す。複数の実験の測定値（白丸）およびその平均（黒四角）と「 \pm S.D.」を表す。

【図 6】

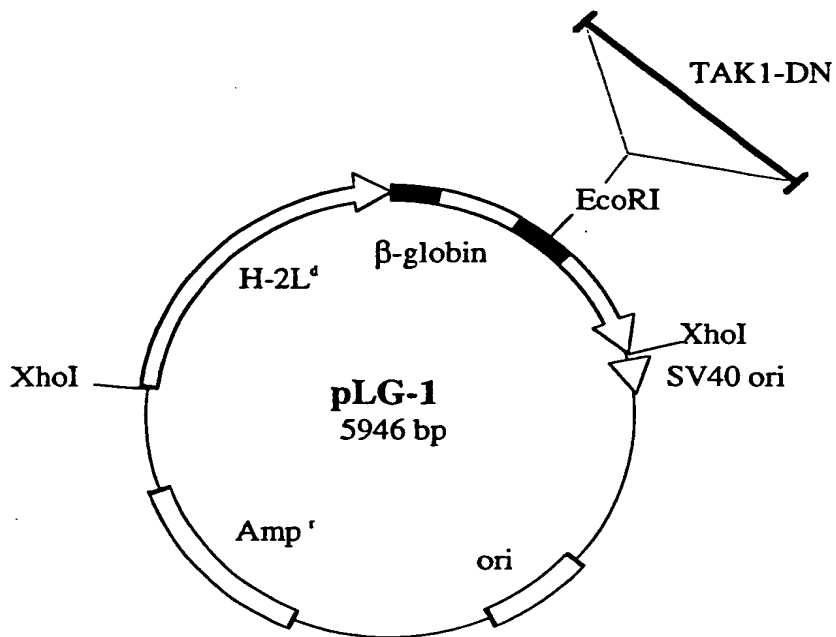
図 6 は、TAK1-DN発現トランスジェニックマウス由来腹腔マクロファージにおけるLPS刺激およびIL-1 α 刺激後のI κ B α のプロテアソームにおける分解を解析した結果を示す。

【図 7】

図 7 は、CHO 細胞を用いたツーハイブリッドシステムの結果を示すグラフである。結果は3 穴から調製した細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性の平均±S.D.を示す。

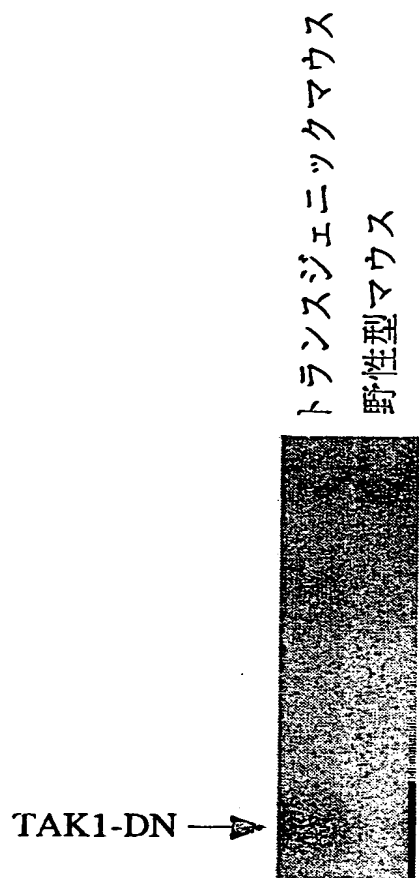
【書類名】 図面

【図 1】

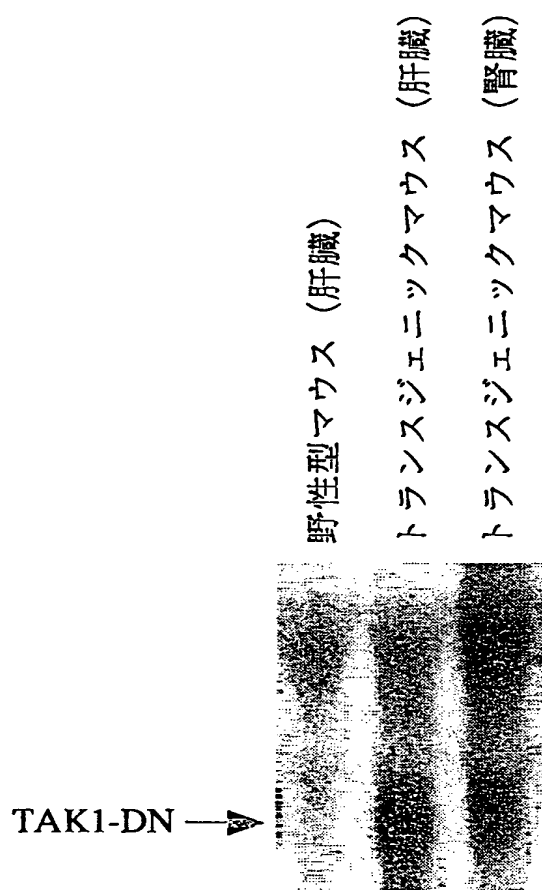


Amp^r : アンピシリン耐性遺伝子
 SV40 ori : SV40複製起点
 β-globin : ウサギβグロビン遺伝子
 ori : pBR複製起点
 H-2L^d : マウスH-2L^dプロモーター

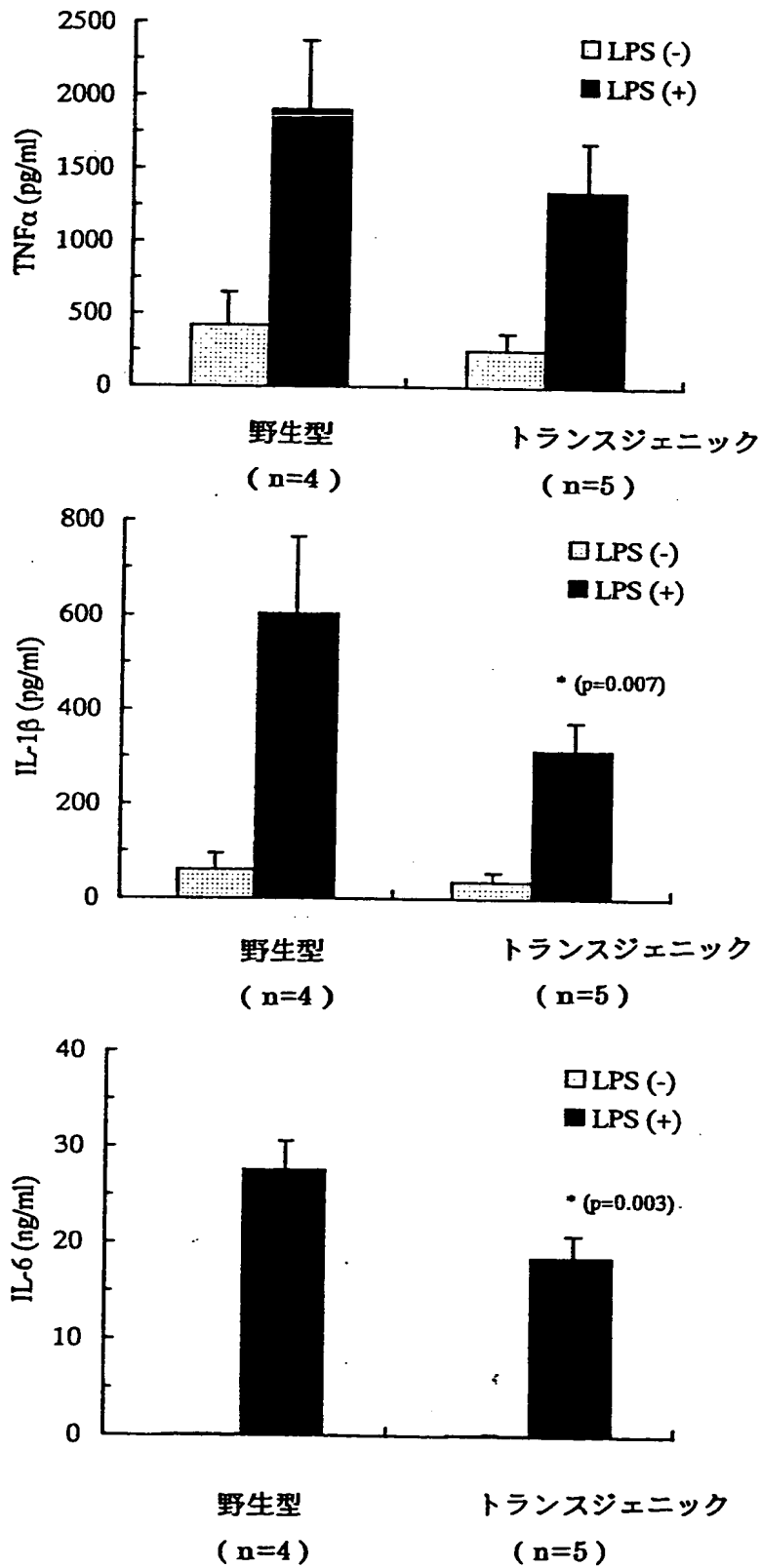
【図 2】



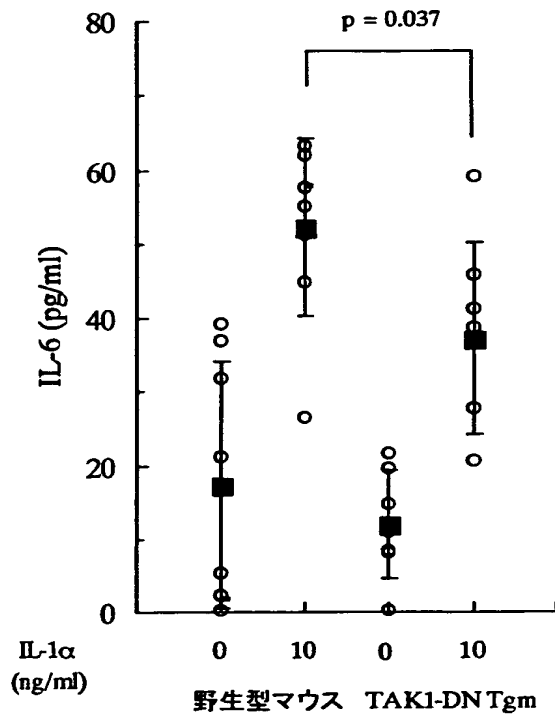
【図 3】



【図 4】

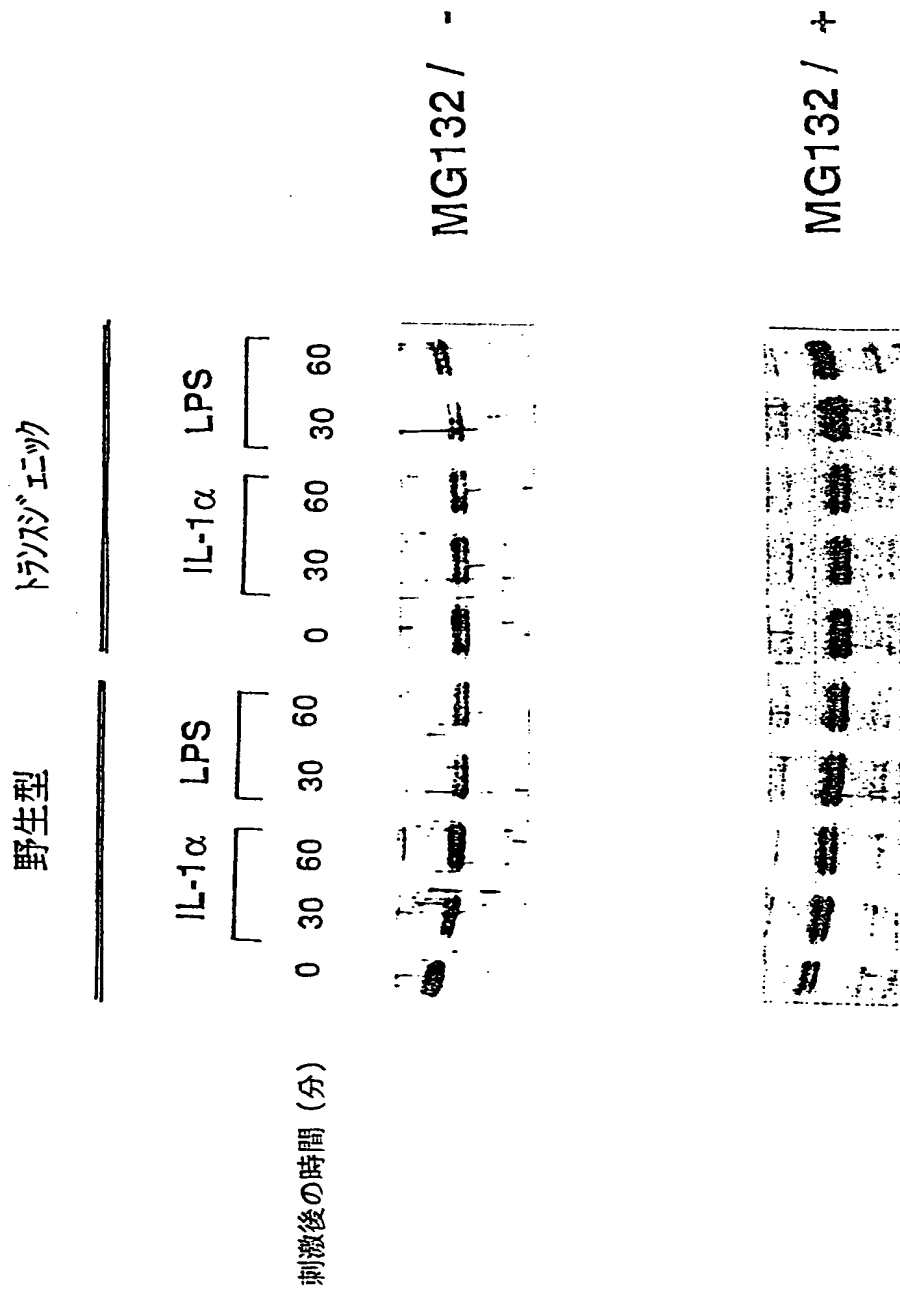


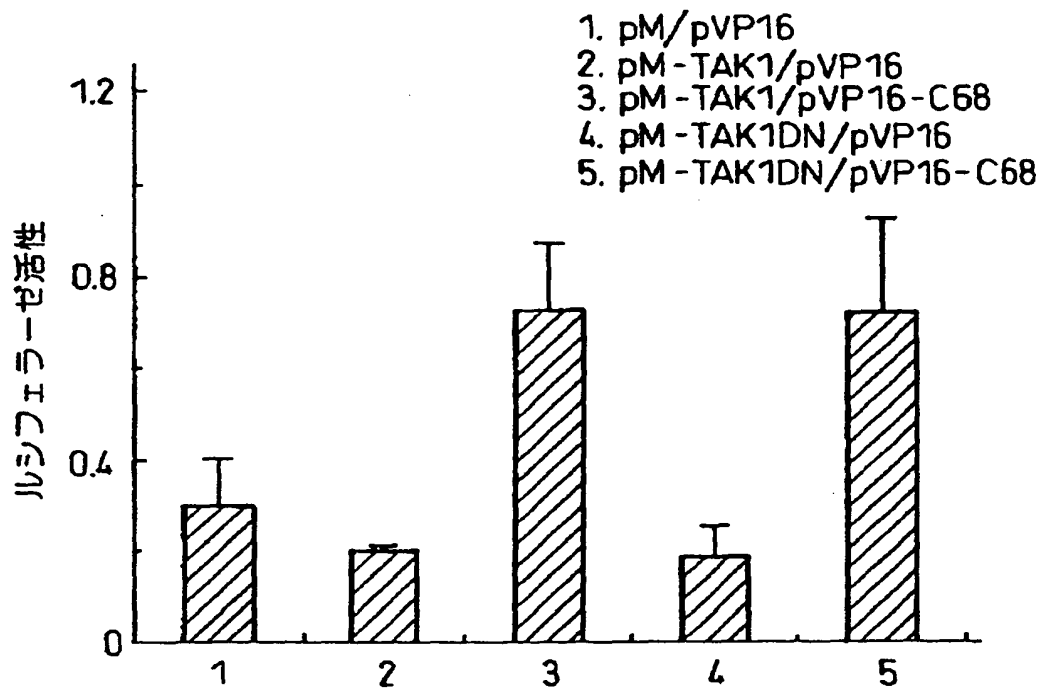
【図 5】



【図 6】

【図 7】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法、該スクリーニング方法により単離しうる化合物及びその用途、並びにTAK1のシグナル伝達を阻害する化合物を有効成分として含有する炎症性サイトカインのシグナル伝達阻害剤を提供することを課題とする。

【解決手段】 TAK1のシグナル伝達を阻害することにより、炎症性サイトカインの作用が抑制されること、炎症性の刺激により誘導されるIL-1及びTNF等の炎症性サイトカインの産生が抑制されること、及び炎症性サイトカインにより誘導されるIL-6等の他の炎症性サイトカインの産生が抑制されることを見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000003311
【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社